

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo do mecanismo de ação de derivados naftoimidazólicos
de β -lapachona sobre *Trypanosoma cruzi*

por

Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Dissertação apresentada visando à obtenção do Título de Mestre em Ciências na
área de Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Dra. Solange Lisboa de Castro

Dr. Maurilio José Soares

fevereiro 2006

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta Dissertação intitulada:

Estudo do mecanismo de ação de derivados naftoimidazólicos
de β -lapachona sobre *Trypanosoma cruzi*

apresentada por

Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes
membros:

Dra. Tânia C. Araújo-Jorge – IOC/FIOCRUZ

Dr. Álvaro J. Romanha - CPqRR/FIOCRUZ

Dra. Thaïs C. B. S. Souto-Padrón - IMPG/UFRJ

Dra. Helene S. Barbosa (revisora/suplente) – IOC/FIOCRUZ

Dr. Ricardo M. Santa-Rita (suplente) – Farmanguinhos/FIOCRUZ

Dissertação defendida e aprovada em ___ de fevereiro de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

MENNA-BARRETO, RUBEM F. S.

Estudo do mecanismo de ação de derivados naftoimidazólicos de β -lapachona sobre *Trypanosoma cruzi*
FIOCRUZ, 2006.

xii, 139 p.; 29,7 cm

Dissertação (Mestrado) - Ciências: Biologia Celular e Molecular.
Fundação Oswaldo Cruz, 2006

Bibliografia: p. 73-100

1. *Trypanosoma cruzi*

2. Naftoquinonas

3. β -Lapachona

4. Naftoimidazóis

Esta dissertação foi desenvolvida sob orientação dos Drs. Solange Lisboa de Castro e Maurilio José Soares no Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro do CNPq.

Esta dissertação é composta por 2 artigos:

Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. J Antimicrob Chemother 2005;56:1034-1041.

Menna-Barreto RFS, Pinto MCFR, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. Naphthoimidazoles from β -lapachone: a new class of derivatives active against *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents 2006. (Submetido à publicação).

Data de matrícula no programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: março de 2004.

Durante a realização desta dissertação participei também das seguintes publicações:

Corrêa JR, Atella G, Menna-Barreto RFS, Soares MJ. Endocytic portals in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi*. J Cell Biol 2005. (Submetido à publicação).

Souza EM, Menna-Barreto RFS, Araújo-Jorge TC, Kumar A, Hu Q, Boykin DW, et al. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol 2005. (Submetido à publicação).

"Sou suficientemente artista para caminhar livremente com a minha imaginação. A imaginação é mais importante que o próprio conhecimento, uma vez que este é limitado. Já a imaginação cerca o mundo."

Albert Einstein
(1879-1955)

Agradecimentos

Começarei agradecendo àqueles a quem devo esta dissertação. O que dizer à Dra. Solange de Castro e ao Dr. Maurilio Soares? Nunca terei como pagar aquilo que fizeram por mim. Sou grato pela orientação e dedicação de vocês, me ensinando coisas que levarei para o resto da vida. Espero ser digno da confiança em mim depositada.

Aos meus pais, Renato e Maria Cristina, minha madrinha Maria da Glória, e minha avó Lydia por tanta dedicação, paciência, carinho que sempre me proporcionam. São meu exemplo de vida, de quem me orgulho muito. Também a toda minha família por todo apoio que encontrei nos momentos em que mais precisei. Aos meus avôs José e Hélio (*in memoria*) que tanto queriam me ver chegar até aqui. Esta dissertação também é para vocês.

À Cynthia Cascabulho, pela sua enorme compreensão e por ser uma pessoa maravilhosa. Obrigado por sempre me ouvir quando eu mais precisava. Eu quero você sempre ao meu lado. Agradeço também pela dedicação na correção final desta dissertação.

À Dra. Andréa Henriques-Pons, grande amiga e gurú em citometria de fluxo, a quem devo ensinamentos de como pensar e discutir ciência. Com ela, aprendi a acreditar mais no meu trabalho e em mim mesmo.

Ao Marcos Meuser pelo excelente trabalho técnico, sem o qual esse trabalho não seria possível.

Ao Bruno Ávila devo a arte final desta dissertação. Com sua calma e paciência, agradeço por levar o trabalho à perfeição.

À Eliete Perez e Cleide Souza pela paciência e boa vontade, em todas as milhares de vezes em que foram solicitadas.

Ao Rafael de Moura que, além de um grande amigo em todos os momentos, nas horas vagas fez um excelente trabalho na edição dos vídeos apresentados nesta dissertação. Essa vitória também é sua.

Aos amigos de sempre Clóvis Costa e Silva, Armando Pinto, Priscila Aquino e Raquel Soares por tudo que passamos, e ainda passaremos juntos por muitos e muitos anos. Em especial, ao Rafael Azevedo (*in memoria*) por ter sido um grande homem, amigo e sincero. Minha admiração pela sua força e vontade de viver é eterna.

À Andréia “Raio” Dantas e Ricardo Santa-Rita por tudo que me ensinaram no

período em que trabalhamos juntos como pupilos da Solange. Foram lições que eu nunca esquecerei.

Ao LBCM, que me acolheu de braços abertos, possibilitando quantas e quantas discussões proveitosas. Obrigado Carolina Spiegel, Camila Adade, Leandro Molina, Patrícia Meuser e em especial a Margareth (H') e sua filha Maurilete, pelo carinho e cumplicidade compartilhados. Em especial a José Raimundo Corrêa pela ajuda e paciência, sempre incansável, seja em assuntos “informáticos” ou “moleculares” e a Giani Santoro pelas sugestões e apoio para que esta dissertação saísse o mais perfeito possível, junto com a Cynthia, você foi perfeita na procura de “falhas”. Me sinto feliz em poder chamá-los de amigos.

À Mariana Acquarone e Francisco Odêncio pela amizade incondicional estendendo a mão sempre que eu precisei. Estejam sempre por perto.

Aos Drs. Roberto Tedesco, Helene Santos Barbosa, Miriam Pereira, Tânia de Araújo-Jorge, Maria de Nazaré Soeiro, Maria de Nazareth Meirelles e Suzana Corte-Real, pelas discussões científicas e ajuda incondicional sempre que solicitados.

Às companheiras da quimioterapia Elaine Motta e Kelly Salomão pela ajuda na bancada e fora dela quando precisei. Obrigado.

A toda a galera do DUBC que durante toda a iniciação científica e mestrado contribuiu de alguma maneira para que o trabalho fluísse como necessário.

Ao pessoal do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais da UFRJ, em especial ao Dr. Antônio Ventura Pinto, Maria do Carmo Pinto e Kelly Gallan de Moura, por sintetizar e ceder os naftoimidazóis. Sem eles, não haveria a matéria prima do nosso trabalho.

Ao CNPq e FIOCRUZ pelo suporte financeiro.

RESUMO

Foram sintetizados e ensaiados sobre formas tripomastigotas sangüíneas de *Trypanosoma cruzi* 60 derivados de naftoquinonas pertencentes aos grupos dos imidazóis, oxazóis, fenoxazóis e das fenazinas. Os compostos mais ativos foram três naftoimidazóis derivados de β -lapachona com grupamento fenila (**N1**), 3-indolila (**N2**) ou *p*-metil fenila (**N3**) ligado ao anel imidazólico.

Estudos com **N1**, **N2** e **N3** demonstraram atividade sobre tripomastigotas ($IC_{50}/1$ d oscilando na faixa de 12 a 37 μ M na ausência de sangue, e entre 62 e 68 μ M na presença de sangue), amastigotas ($IC_{50}/1$ d variando entre 9 e 14 μ M) e epimastigotas ($IC_{50}/1$ d entre 30 e 83 μ M). Tratamento de macrófagos com os três naftomidazóis por 4 dias inibiu a infecção em até 91,2% (**N1**), 93,9% (**N2**) e 94,1% (**N3**). A infecção foi também diminuída em cardiomiócitos tratados com **N1** (31-47%). Danos nos macrófagos ocorreram apenas em concentrações pelo menos 10x maiores que as utilizadas durante os ensaios. Estes resultados nos estimulam a realizar estudos *in vivo*.

Tratamento de epimastigotas com **N1**, **N2** ou **N3** induziu alterações morfológicas como inchaço mitocondrial, ruptura da “Trans Golgi Network” e desorganização de reservosomos. Apesar do dano observado nessas organelas, os compostos não interferiram com a marcação de transferrina-Au em compartimentos endocíticos iniciais, sugerindo que o efeito sobre a via endocítica ocorra apenas na porção terminal da via (reservosomos). Foram ainda observados em epimastigotas tratados perfis de retículo endoplasmático envolvendo diferentes organelas. Tripomastigotas tratados apresentaram inchaço mitocondrial, alterações na rede de kDNA, formação de “blebs” na membrana plasmática e condensação anormal de cromatina, além de uma perda da eletrondensidade de acidocalcisomos (tratamento com **N1**). Os três naftoimidazóis inibiram a atividade de succinato citocromo c redutase em epimastigotas, bem como o processo de metaciclogênese.

Resultados obtidos pela análise ultra-estrutural e por citometria de fluxo apontam a mitocôndria e compartimentos acídicos de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* como alvos iniciais de **N1**, **N2** e **N3**. A inibição da succinato citocromo c redutase reforça a hipótese do comprometimento mitocondrial em consequência do tratamento. O efeito dos três compostos sobre o DNA de *T. cruzi* foi semelhante ao efeito de β -lapachona, previamente descrito pelo grupo do Dr. R. Docampo. É possível que tal efeito seja decorrente da estrutura planar dos naftoimidazóis e desta naftoquinona.

ABSTRACT

Sixty naphthoquinone derivatives – classified either as oxazoles, imidazoles, phenoxazoles or phenazines - were synthesized and assayed against *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes. The most active compounds were naphthoimidazole derived from β -lapachone and containing a phenyl (**N1**), a 3-indolyl (**N2**) or a *p*-methyl phenyl (**N3**) moiety linked to the imidazole ring.

Assays with **N1**, **N2** and **N3** demonstrated activity on trypomastigotes (IC₅₀/1 d ranging between 12 to 37 μ M in the absence of blood, and between 62 to 68 μ M in the presence of blood), amastigotes (IC₅₀/1 d ranging between 9 and 14 μ M), and epimastigotes (IC₅₀/1 d ranging between 30 and 83 μ M). Treatment of macrophages with the naphthoimidazoles for 4 days inhibited the infection up to 91.2% (**N1**), 93.9% (**N2**) and 94.1% (**N3**). Infection was also inhibited in **N1**-treated cardiomyocytes (31-47%). Damage to macrophages occurred only in concentrations 10x higher than that used during the assays. These results stimulate us to perform further *in vivo* studies.

Treatment of epimastigotes with **N1**, **N2** or **N3** induced morphological alterations such as mitochondrial swelling, Trans Golgi Network disruption and reservosomes disorganization. Despite the observed damage to these organelles, the compounds did not interfere with transferrin-Au labeling in early endocytic compartments, suggesting that the effect on the endocytic pathway occurs only at the pre-lysosomal level (reservosomes). Endoplasmic reticulum profiles surrounding organelles were also observed in epimastigotes. Trypomastigotes treated with **N1**, **N2** or **N3** presented mitochondrial swelling, alterations in the kDNA network, bleb formation at the plasma membrane, abnormal chromatin condensation, and loss of electron-density in acidocalcisomes (only in **N1**-treated parasites). All three derivatives inhibited the activity of succinate cytochrome c reductase, as well as the metacyclogenesis process.

The ultrastructural data together with flow cytometry results point to the mitochondrion and acidic compartments of *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes as initial targets of **N1**, **N2** and **N3**. The inhibition of succinate cytochrome c reductase reinforces the hypothesis of mitochondrial susceptibility due to the treatment. The effect of all three compounds on *T. cruzi* DNA was similar to that previously described for β -lapachone by the group of Dr. R. Docampo. It is possible that such effect is caused by the planar structure of the naphthoimidazoles and of this naphthoquinone.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida
CaCl₂ = cloreto de cálcio
DME = meio Eagle modificado por Dulbecco
DMES = DME + 10% soro fetal bovino + 2% L-glutamina
DMSO = dimetilsulfóxido
DNA = ácido desoxirribonucléico
ECLAT = European Community and Latin America Triatominae Research Network
FDA = Food and Drug Administration
GA = glutaraldeído
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
HIV = vírus da imunodeficiência humana
IC₅₀ = concentração que inibe 50% dos parasitas
IV = índice de variação
kDNA = DNA de cinetoplasto
LA = laranja de acridina
LAFEPE = Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
MET = microscopia eletrônica de transmissão
MEV = microscopia eletrônica de varredura
NPPN = Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
N1 = 4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-fenil-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d]imidazol
N2 = 3,4-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-indolil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d]imidazol
N3 = 4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-metilfenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d]imidazol
NO = óxido nítrico
OMS = Organização Mundial de Saúde
OsO₄ = tetróxido de ósmio
PBS = solução salina tamponada com fosfato
PCR = reação de polimerase em cadeia
PI = iodeto de propídio
R-123 = rodamina 123
RNA = ácido ribonucléico
SFB = soro fetal bovino
Tf-Au = transferrina acoplada à partícula de ouro coloidal
UV = ultravioleta

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	2
1.1.1. Curso da doença	2
1.1.2. O parasita	3
1.1.3. Aspectos da epidemiologia e controle da doença	9
1.1.4. Tratamento clínico	12
1.1.5. Desenvolvimento de novos quimioterápicos	14
1.2. Naftoquinonas	16
1.2.1. Lapachol, α - e β -lapachona	17
1.2.2. Atividade sobre tripanosomatídeos	20
1.2.3. Derivados de β -lapachona	22
2. OBJETIVOS	25
3. ARTIGO 1	27
4. ARTIGO 2	37
5. DISCUSSÃO GERAL	61
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXO 1 - Moura et al. (2004)	101
9. ANEXO 2 - Pinto et al. (2005)	110
10. ÍNDICE REMISSIVO	133

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

Esta doença, também denominada tripanosomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo uma zoonose difundida no continente latino-americano, sendo descoberta em 1909 por Carlos Chagas, quem caracterizou o parasita e seu ciclo, o inseto vetor, bem como a via de transmissão. Acredita-se que a relação entre os seres humanos e o *T. cruzi* nas Américas antecede à colonização, tendo sido confirmada a presença de DNA do protozoário por reações de PCR em múmias andinas datadas de 4000 anos (Rothhammer et al., 1985; Guhl et al., 1999; Ferreira et al., 2000), e mais recentemente em múmias sub-andinas de até 9000 anos de idade, encontradas essencialmente em regiões costeiras do deserto do Atacama, entre o sul do Perú e norte do Chile (Aufderheide et al., 2004).

1.1.1. Curso da doença

Em geral, o sítio de entrada do parasita no Homem é marcado por uma lesão de pele denominada chagoma de inoculação, que no caso específico da conjuntiva ocular é denominado sinal de Romaña (Fig. 1.1).



Figura 1.1. Alteração de porta de entrada do *T. cruzi*. Sinal de Romaña característico: edema bipalpebral unilateral com enfartamento ganglionar satélite (Spectroscopy Now, capturado em 26/07/2005).

Após um período de incubação de cerca de sete a dez dias inicia-se a fase aguda, caracterizada por alta parasitemia e presença de infiltrados inflamatórios em diferentes tecidos. Em cerca de 2% dos indivíduos infectados a doença se apresenta oligossintomática, com maior gravidade em crianças com menos de dois anos de idade, podendo a mortalidade atingir, na ausência de tratamento, até 10% dos casos (revisto em Lopes & Chapadeiro, 1997).

A maioria dos casos agudos não tratados evolui para a forma crônica indeterminada, que consiste na presença da infecção (revelada por sorologia e/ou métodos parasitológicos indiretos) associada à ausência de sintomatologia e a exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos (coração, esôfago e cólon) normais (Macêdo, 1997; Ribeiro & Rocha, 1998). A maioria dos adultos permanece nesta fase por toda a vida, sendo que cerca de 36% dos pacientes evoluem, após

10-20 anos, para a fase crônica (revisto em Rassi, 1982; Andrade, 1985; OMS, 1997). Entre os chagásicos crônicos, cerca de 27% têm dano cardíaco progressivo resultante da destruição de células do sistema condutor, com insuficiência cardíaca, distúrbios de ritmo e condução e aumento do coração, podendo ocorrer morte súbita. Comprometimento digestório, com uma prevalência de cerca de 6%, é caracterizado por alterações da secreção, motilidade, absorção e, nos casos mais graves, pelo aparecimento de megavísceras (cólon e esôfago) (Köberle, 1956; Rezende, 1984). Ainda 3% destes casos estão associados a lesões neurológicas periféricas, principalmente meningoencefalites (OMS, 1997).

1.1.2. O parasita

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Esta espécie é composta por um grande número de populações, com diferentes características morfológicas, de virulência, de patogenicidade e de susceptibilidade a drogas, além de variações em nível molecular. O seu ciclo evolutivo compreende um hospedeiro invertebrado (triatomíneo hematófago) e um hospedeiro vertebrado (mamíferos, incluindo o Homem). O inseto vetor do *T. cruzi*, conhecido popularmente como barbeiro, pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Figs. 1.2a,b). Os gêneros mais importantes do ponto de vista da transmissão da doença de Chagas são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, envolvendo mais de 120 espécies (Lent & Wygodzinsky, 1979).

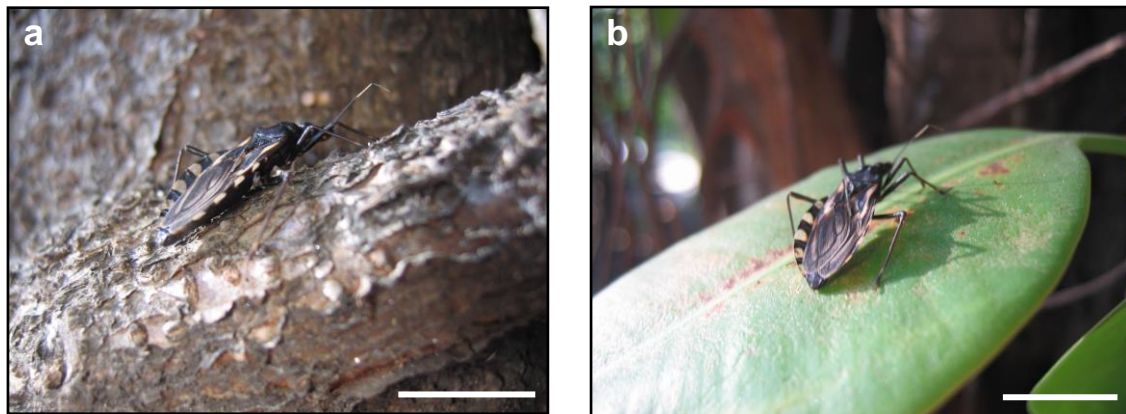


Figura 1.2. (a,b) Triatomíneo, vulgarmente conhecido como barbeiro, vetor da doença de Chagas. Barras = 2 cm.

No inseto, formas epimastigotas proliferam por divisão binária no lúmen do intestino médio e então migram para a porção final do intestino, onde sofrem o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, não proliferativos, que são eliminados juntamente com as fezes e urina durante alimentação do inseto no mamífero (Brack, 1968; Brener & Alvarenga, 1976). No hospedeiro vertebrado, estas formas metacíclicas penetram em macrófagos e em células de tecidos no sítio de inoculação (Deutschländer et al., 1978), escapam do vacúolo fagolisosomal e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam no citoplasma das células hospedeiras. Após vários ciclos reprodutivos, os parasitas sofrem novamente uma diferenciação para formas tripomastigotas, que são liberadas após ruptura da célula hospedeira, podendo invadir outras células e tecidos através da corrente sanguínea, ou serem ingeridas pelo inseto vetor, no qual irão se diferenciar para epimastigotas, completando assim o ciclo de vida do *T. cruzi* (Fig. 1.3).

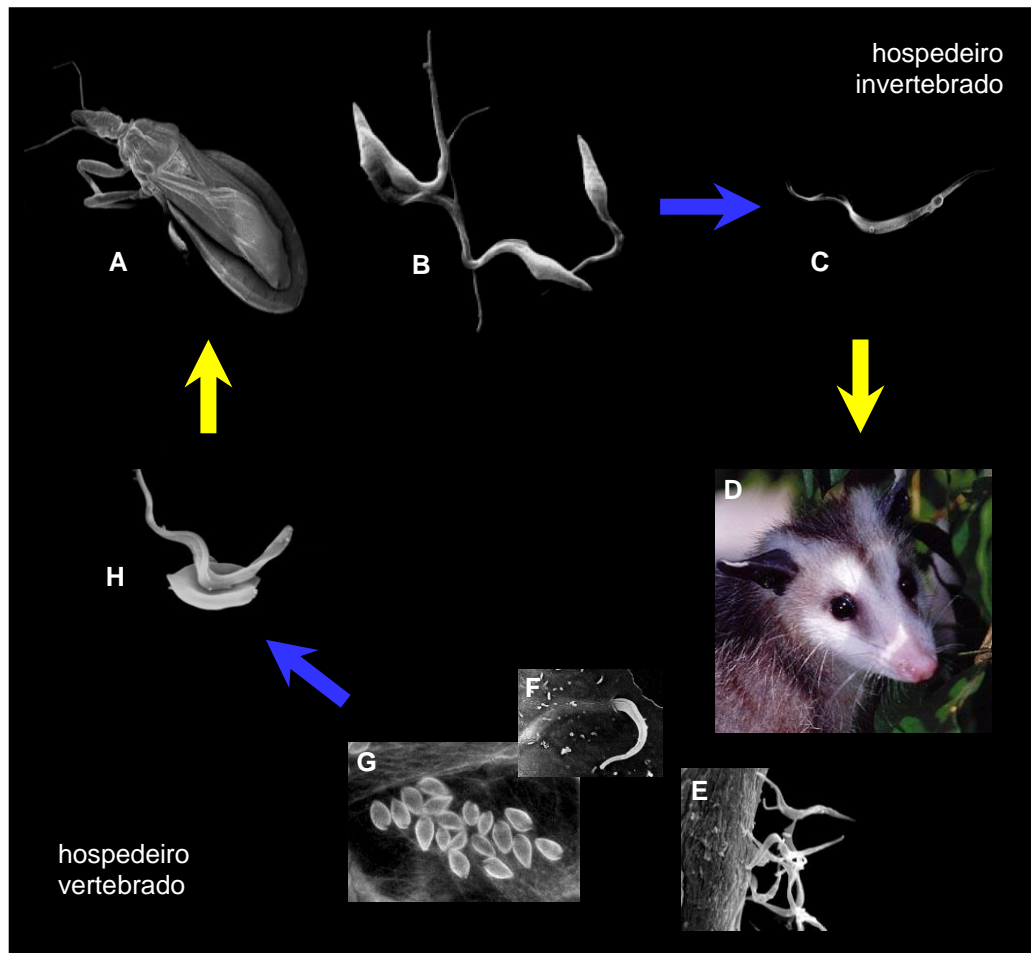


Figura 1.3. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* - No hospedeiro invertebrado (A) formas epimastigotas (B) se multiplicam no lúmen do intestino. Diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (C) ocorre na porção final do intestino. Estas formas infectam o hospedeiro vertebrado (D). Após adesão (E) e penetração (F) nas células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas multiplicativos (G). após diferenciação e liberação de tripomastigotas sangüíneos (H), estas formas podem invadir músculos e outros tecidos. O ciclo se fecha quando o indivíduo infectado é picado pelo triatomíneo (A: Demetry C, capturado em 26/07/2005; B: Santa-Rita et al., 2005; C: Vatarunakamura et al., 2005; D: USP, capturado em 26/07/2005; E: Barbosa HS, capturado em 26/07/2005; F: Andrews N, capturado em 26/07/2005; G: FIOCRUZ, capturado em 25/07/2005; H: Dantas et al., 2003).

Um esquema comparativo das formas do parasita está representado na Figura 1.4.

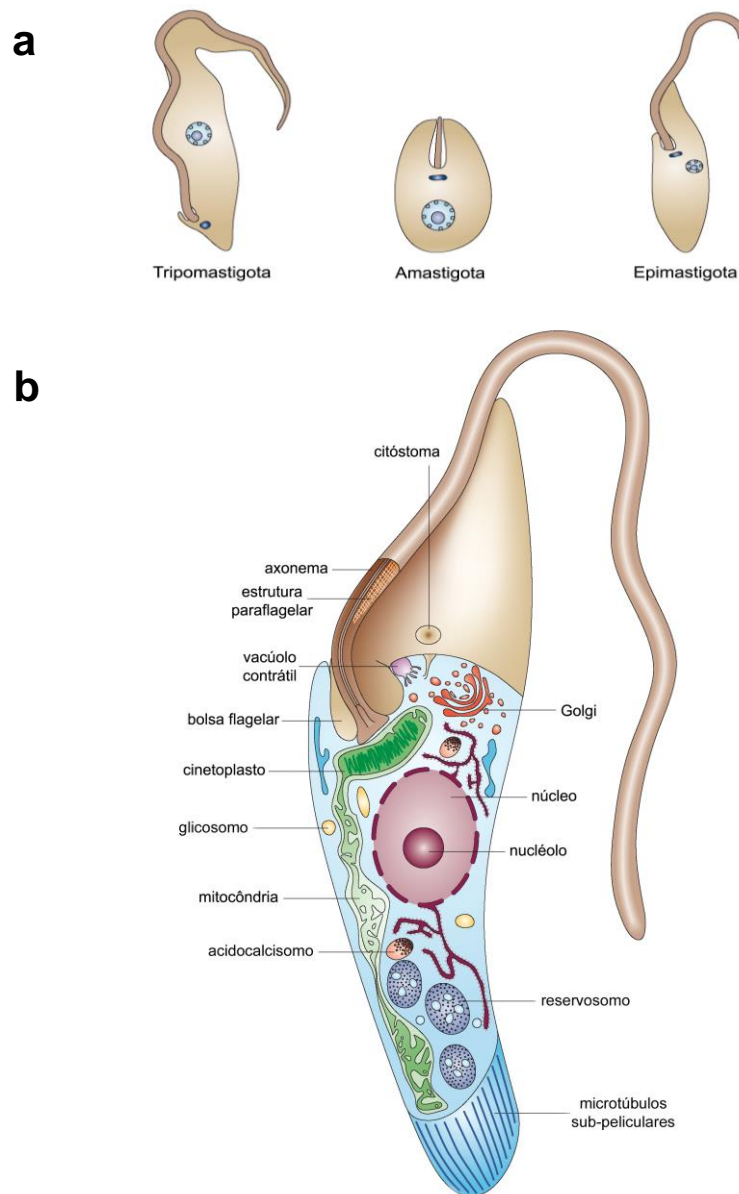


Figura 1.4. Desenhos esquemáticos de *T. cruzi*. **(a)** Diferenças na inserção do flagelo entre as formas tripomastigota, amastigota e epimastigota. **(b)** Ultra-estrutura de epimastigota (adaptado de Docampo et al., 2005).

Proliferação extracelular de epimastigotas e sua diferenciação para tripomastigotas metacíclicos também foram observadas em glândulas de cheiro

de *Didelphis marsupialis*, o hospedeiro reservatório do *T. cruzi* (Deane et al., 1984; Jansen et al., 1997).

Experimentos indicam que as células infectadas tornam-se mais susceptíveis a uma segunda invasão, provavelmente devido a modificações na carga de superfície decorrentes da infecção (Soeiro et al., 1994). Em animais infectados existem evidências de um tropismo do parasita por células hospedeiras do sistema fagocítico mononuclear e por células musculares e nervosas (Melo & Brener, 1978). Em diferentes modelos de interação parasita e célula hospedeira *in vitro* foram identificadas duas fases, uma de reconhecimento e outra de invasão, seguidas de multiplicação intracelular do parasita (Meirelles & De Souza, 1983; Meirelles et al., 1986).

O *T. cruzi*, como outros tripanosomatídeos, possui as organelas típicas de células eucarióticas, assim como algumas que lhe são próprias (revisto em De Souza, 1984, 2002). Sua membrana plasmática é composta por proteínas, lipídeos e carboidratos, estes últimos distribuídos na superfície externa (Benchimol et al., 1977; De Souza et al., 1978). Microtúbulos subpelículas distribuem-se por todo o corpo do parasita e formam um citoesqueleto imediatamente abaixo da membrana plasmática. Um grande número de proteínas está associado à membrana através de penilação ou âncoras de glicosilfosfatidilinositol (Schenkman et al., 1988). O colesterol presente nas membranas do parasita não é sintetizado por ele, mas captado do hospedeiro ou do meio através de receptores específicos (Soares & De Souza, 1991), sendo o ergosterol o esteroide endógeno majoritário (Williams et al., 1966; Fagundes et al., 1980).

Nas formas amastigotas e epimastigotas o núcleo é arredondado, diferentemente de tripomastigotas onde este é alongado (Fig. 1.5a). O flagelo tem origem a partir do corpúsculo basal, apresentando um arranjo clássico de microtúbulos tipo 9+2, e se exterioriza através de uma invaginação típica denominada bolsa flagelar. A adesão flagelo-membrana plasmática ocorre por justaposição entre agrupamentos de proteínas intramembranares presentes na superfície de contato do flagelo com o corpo do parasita (Martinez-Palomo et al., 1976; revisto em De Souza, 1984, 2002).

A mitocôndria de *T. cruzi*, única e ramificada, apresenta cristas típicas e enzimas comuns a células eucarióticas (Fig. 1.5b) (Meirelles & De Souza, 1980). Próximo ao corpúsculo basal observa-se uma região denominada de cinetoplasto (Fig. 1.5c), caracterizada pela concentração de DNA (Borst & Hoeijmakers, 1979). O DNA do cinetoplasto (kDNA) é único em sua estrutura, função e modo de replicação, sendo constituído por uma rede de círculos de DNA catenados correspondendo a cerca de 20% do DNA total da célula (Shapiro & Englund, 1995). Os círculos de kDNA são de dois tipos: (a) maxicírculos, presentes em algumas dúzias de cópias, codificam RNAs ribossomais e algumas proteínas mitocondriais e apresentam estrutura similar ao DNA mitocondrial de outros eucariotos; (b) minicírculos, presentes em milhares de cópias, codificam para RNAs guia cujo papel funcional é a edição da transcrição dos maxicírculos, uma vez que estes transcritos são crípticos e necessitam ser editados para formar RNAs mensageiros funcionais (Junqueira et al., 2005; Liu et al., 2005). Embora a estrutura geral do cinetoplasto se mantenha constante durante todo o ciclo evolutivo na maioria dos tripanosomatídeos, em *T. cruzi* ocorrem profundas alterações no seu arranjo durante a transformação epimastigotas - tripomastigotas - amastigotas, sendo uma importante característica na diferenciação entre os diferentes estágios evolutivos (revisto em De Souza, 1980, 1984).

O retículo endoplasmático encontra-se distribuído por toda a célula, inclusive na periferia, podendo estabelecer contato com a membrana plasmática e microtúbulos subpelículas. O complexo de Golgi está localizado na porção anterior do corpo do parasita, próximo ao cinetoplasto e à bolsa flagelar (Fig. 1.5c) (revisto

em De Souza, 2002).

Formas epimastigotas e amastigotas apresentam uma estrutura altamente especializada denominada citóstoma, que está ausente em tripomastigotas (De Souza et al., 1978; revisto em De Souza, 2002). Toda a atividade endocítica de epimastigotas ocorre pela bolsa flagelar e pelo citóstoma (Soares & De Souza, 1991). A incorporação de nutrientes ocorre através da formação de pequenas vesículas, que formam estruturas tubulares (Soares et al., 1992), as quais se fundem a estruturas maiores, denominadas reservosomos (Soares & De Souza, 1988; revisto em Soares, 1999). Os reservosomos são organelas esféricas grandes que estocam proteínas e lipídios, encontradas somente em formas epimastigotas de parasitas do subgênero *Schyzotrypanum* (Fig. 1.5d). Eles se localizam preferencialmente na porção posterior do parasita e têm importante papel durante o processo de metaciclogênese, uma vez que seu conteúdo é consumido, resultando em total desaparecimento da organela ao final da diferenciação (Soares et al., 1989; Figueiredo et al., 1994; De Souza et al., 2000). Esta organela apresenta características acídicas, é rica em cisteína proteinases e não contém fosfatases, sendo assim considerada como um compartimento pré-lisosomal (Soares & De Souza, 1991; Soares et al., 1992). Análise de reservosomos isolados demonstrou a presença de proteínas como cruzipaina (importante enzima proteolítica de *T. cruzi*), de lipídeos como ergosterol e colesterol esterificados, sendo fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina os principais fosfolipídios de membrana (Cunha-e-Silva et al., 2002).

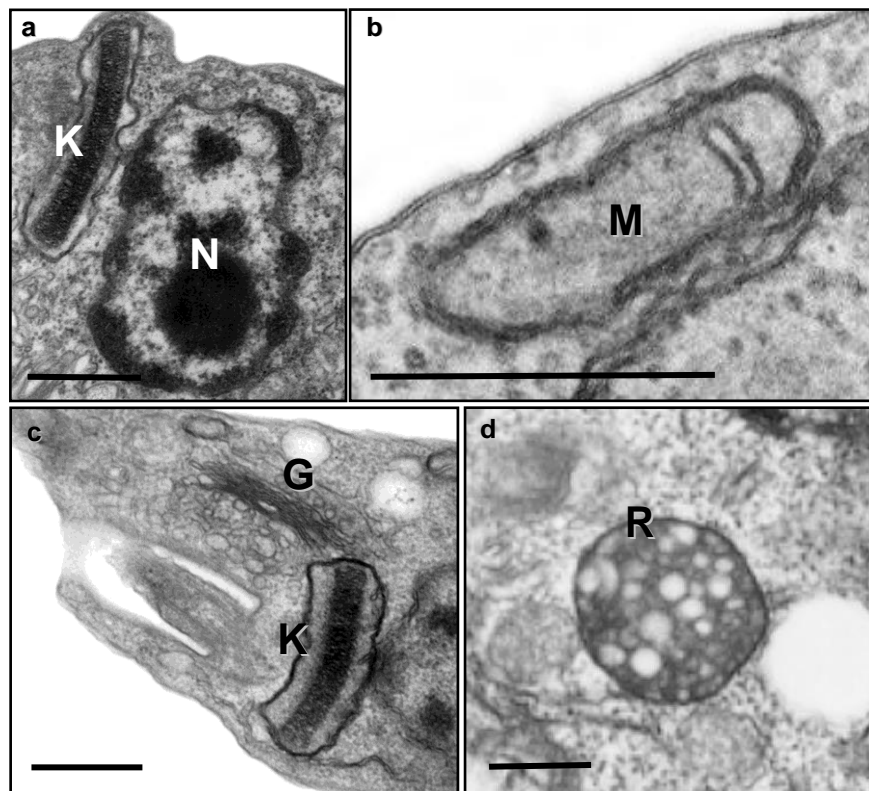


Figura 1.5. Ultra-estrutura de epimastigotas de *T. cruzi* apresentando morfologia típica da mitocôndria (**M**), núcleo (**N**), complexo de Golgi (**G**), cinetoplasto (**K**) e reservosomo (**R**). Barras = 1 µm.

O glicosomo é uma organela semelhante aos peroxissomos encontrados em outras células

eucarióticas, de formato arredondado ou alongado, com matriz densa e homogênea, presente em todas as formas evolutivas do parasita. Em algumas espécies apresenta catalase e enzimas envolvidas na oxidação de aminoácidos e lipídeos. Glicosomos contêm as enzimas envolvidas na via glicolítica, aumentando a eficiência deste processo (De Souza, 1999; revisto em De Souza, 2002).

Acidocalcisomos são organelas acídicas, altamente eletrondensas, que contêm grande parte do estoque de Ca^{2+} em tripanosomatídeos, *Plasmodium berghei* e *Toxoplasma gondii* (Docampo et al., 1995; Scott et al., 1995, 1998; Lu et al., 1997, 1998; Miranda et al., 2000). Através de micro-análise de raios X foi demonstrado nas três formas de *T. cruzi* que acidocalcisomos contêm também grandes quantidades de fósforo, magnésio, potássio, sódio, zinco e ferro (Scott et al., 1997; Corrêa et al., 2002). O fósforo presente está na forma de polifosfatos de cadeia curta ou longa e pirofosfato inorgânico, sendo este último o principal composto fosfatado de alta energia nestes parasitas (Urbina et al., 1999). A entrada de Ca^{2+} nestas organelas ocorre através de uma Ca^{2+} - H^+ ATPase e sua saída pela troca com H^+ através do trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Vercesi & Docampo, 1996; Benchimol et al., 1998; revisto em Docampo, 2001; Docampo et al., 2005).

1.1.3. Aspectos da epidemiologia e controle da doença

As principais vias de transmissão da doença de Chagas são: **(a)** vetorial, representando 80 a 90% dos casos de transmissão; **(b)** transfusional (8 a 18%); **(c)** congênita (2 a 6%) (revisto em Moya & Moretti, 1997; Torrico et al., 2004). Entre outras formas de transmissão estão incluídas as causadas por acidentes em laboratório, principalmente pela via parenteral (Brener, 1984; revisto em Dias, 1990), transplante de órgãos e via oral (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Gus et al., 1993; revisto em Camandaroba et al., 2002). Embora de rara ocorrência, a amamentação pode ser outra via de transmissão da doença de Chagas (Bittencourt et al., 1988).

A transmissão por via oral pode estar correlacionada à ingestão de alimentos contaminados por urina ou fezes de hospedeiros silvestres e/ou de vetores infectados (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Gus et al., 1993). No Estado de Santa Catarina ocorreu em 2005 um surto da doença através da ingestão de caldo de cana contendo o parasita. Possivelmente, a alta carga parasitária observada nos indivíduos infectados, muito superior à decorrente de transmissão vetorial, levou ao óbito de 5 pacientes poucos dias após a infecção. Em nota técnica, a Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde de Santa Catarina totalizou 156 casos suspeitos, 31 confirmados, caracterizando a gravidade do episódio (ANVISA, 31/03/2005; Lewinsohn, 2005a,b). Como foco de contaminação, existe a possibilidade de barbeiros terem sido moídos juntamente com o caldo de cana e/ou a cana conter fezes do inseto. Este surto apresenta características semelhantes às de outros surtos micro-epidêmicos registrados no Amazônia Oriental Brasileira, em Teutônia (Rio Grande do Sul) e em Catolé do Rocha (Paraíba), onde o fator causal comum foi à ingestão de caldo de cana

contaminado Lewinsohn, 2005a. O mesmo autor ainda descreve que em 2001 no estado do Pará, ocorreu também um episódio de transmissão oral da doença de Chagas através da ingestão de suco de açaí.

Ações antrópicas, induzindo mudanças no hábito alimentar de animais que migraram para o peridomicílio e/ou domicílio (Fig. 1.6a,b), alteraram a característica da infecção por *T. cruzi*, inicialmente restrita ao ecótopo silvestre.

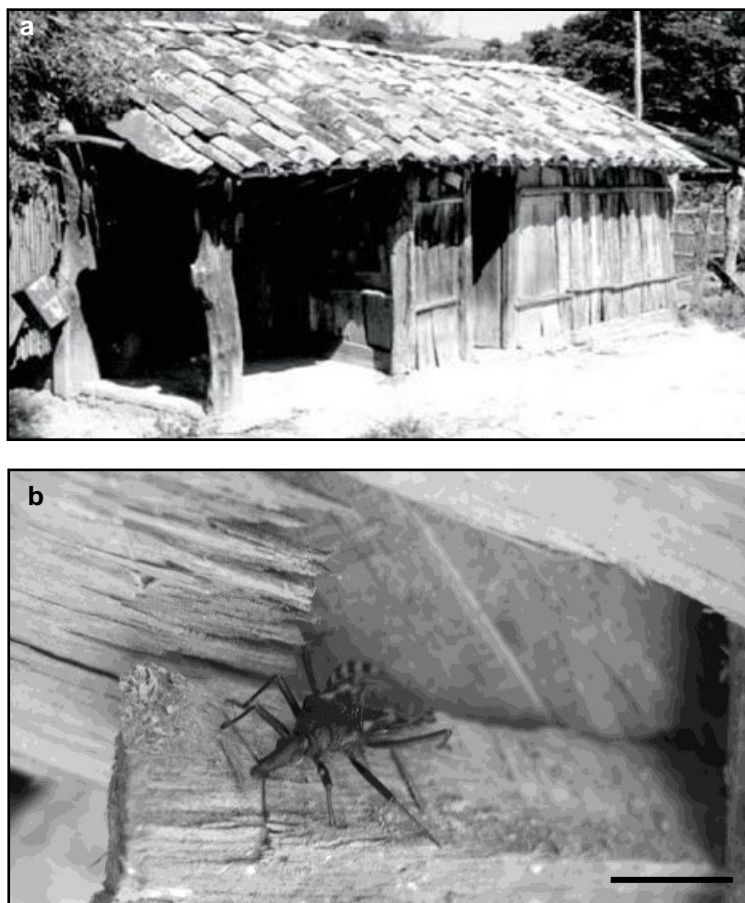


Figura 1.6. Cafua com frestas nas paredes (a), infestada com o triatomíneo (b). Barra = 2 cm. (a: SUCEN, capturado em 26/07/2005).

O controle da doença de Chagas envolve a prevenção da transmissão por: (a) eliminação do inseto vetor, através de inseticidas de longa ação residual; (b) seleção de doadores em bancos de sangue e/ou a esterilização do sangue utilizado para transfusão; e (c) melhoria das moradias e programas de educação sanitária (Dias, 1987).

Atividades de controle vetorial começaram nos anos 40, inicialmente por melhorias em habitações e aplicação de inseticidas em Bambuí (MG), uma experiência de campo bem sucedida, que foi reproduzida no estado de São Paulo, na Argentina, Venezuela e no Chile. O programa brasileiro teve sua implementação

somente após os anos 70, impulsionado por evidências científicas do alto impacto social desta doença (Dias et al., 2002b).

Devido à migração de áreas endêmicas para outros centros, a transfusão sanguínea aumentou sua importância como via de transmissão. Por exemplo, em 1990 nos Estados Unidos da América do Norte, 7 milhões de pessoas emigraram de países nos quais a doença de Chagas era endêmica (Schmunis et al., 2001). Em artigo publicado no jornal New York Times em 18 de novembro de 2003, McNeil relatou a preocupação de especialistas em saúde pública nos EUA de que doença de Chagas poderia ameaçar o suprimento de sangue no país. Disse ainda que desde 1989 existe a recomendação de realizar exames sorológicos para doença de Chagas em todo sangue a ser doado, porém até o momento nenhum ensaio foi aprovado pela agência americana FDA (Food and Drug Administration).

Visando a prevenção da doença de Chagas transfusional, a Organização Mundial de Saúde recomendou o uso do corante violeta de genciana em serviços hemoterápicos localizados em áreas endêmicas (OMS, 1984). Devido à variação, entre vários fabricantes, na composição de violeta de genciana, este corante foi substituído por cristal violeta (seu principal componente) com forma quimicamente definida, sendo assim mais seguro. Cristal violeta não apresenta efeitos colaterais importantes, porém existem restrições ao seu uso devido a relatos sobre alterações em eritrócitos, carcinogenicidade potencial, e não aceitação pelos pacientes devido à sua coloração (Thomas & McPhee, 1984). Seu mecanismo de ação envolve a formação de radicais livres, tendo como alvo principal a mitocôndria (Gadelha et al., 1989; revisto em Docampo, 1990).

Com a emergência da AIDS, iniciou-se nos anos 80, um movimento visando à melhoria da qualidade do sangue, com triagem de doadores de sangue através de exames para detecção da doença de Chagas (revisto em Dias et al., 2002b). Um levantamento realizado no Hemocentro de São Paulo (SP) no período entre 1996 e 2001 mostrou que a prevalência de soros positivos para esta doença encontrava-se na taxa de 186 casos por 10.000 ao ano (Sabino et al., 2003).

Avanços no controle do vetor têm ocorrido nos países do Cone Sul por iniciativa da Organização Pan-Americana de Saúde e da Organização Mundial da Saúde (Schofield & Dias, 1999; OMS, 2002; Vinhaes & Schofield, 2003). Os números relativos à prevalência, incidência e mortalidade decorrentes da doença de Chagas estão constantemente sendo reduzidos como resultado do impacto deste controle. As transmissões vetorial e transfusional desta doença foram interrompidas no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e em 8 dos 12 estados endêmicos do Brasil em 2000, levando a uma redução de 94% da incidência de novas infecções no Cone Sul (revisto em Moncayo, 2003).

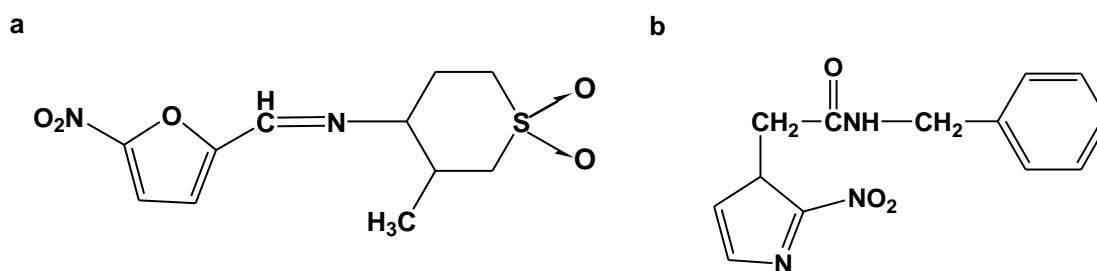
Lainson e colaboradores (1979) em um levantamento no estado do Pará detectaram parasitas “*T. cruzi-like*” em diferentes espécies de animais silvestres, além de três casos autóctones de infecção humana, que se somaram a 4 outros anteriormente descritos (Shaw et al., 1969). Estes dados levantaram a possibilidade da doença de Chagas se tornar endêmica na Amazônia, através da domiciliação de vetores. No decorrer da década de 90, Coura e seus colaboradores apresentaram

um painel da doença de Chagas nesta região através de estudo de campo sistemático, envolvendo dados sorológicos e epidemiológicos e incluindo monitoramento de reservatórios e de vetores (Coura et al., 1994, 1995a,b, 1999, 2002a). O aumento de casos nesta região no período 1969-2002 indicou que a doença de Chagas poderia emergir como um sério problema de Saúde Pública na Amazônia (revisto em Coura et al., 2002b), levando a Fundação Nacional de Saúde a solicitar uma análise desta situação. Assim, ocorreu em Palmari (estado do Amazonas) uma reunião de especialistas, coordenada pela ECLAT (European Community and Latin America Triatominae Research Network), na qual concluiu-se que doença de Chagas na região é ainda esporádica, mas com uma grande possibilidade de ampliação de área de risco e requerendo assim um esforço de vigilância objetivo e integrado, compartilhado por todos os países da região (Dias et al., 2002a).

1.1.4. Tratamento clínico

O tratamento clínico da doença de Chagas é restrito ao uso de benznidazol (Rochagan®, Roche, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida), uma vez que a produção de nifurtimox (Lampit®, Bayer, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) foi descontinuada na década de 80 na América do Sul. Mais recentemente em 2005, a Roche também interrompeu a produção do benznidazol no Brasil, cedendo os direitos de patente deste medicamento ao governo brasileiro, ficando a encargo sua fabricação, comercialização e possível exportação para outros países sul-americanos. A cessão da patente vem sendo negociada com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (Coura JR, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos com estas duas drogas (Esquema 1) variam com a fase da doença de Chagas, o período de tratamento e a dose, a idade e a origem geográfica dos pacientes. Em geral os resultados foram considerados bons no tratamento de casos agudos e recentes da infecção, principalmente em crianças, estimando-se um percentual médio de cura parasitológica em torno de 60%. Em relação à infecção crônica os resultados têm sido pobres, de acordo com a experiência brasileira, enquanto em outros países do Cone Sul o tratamento tem sido mais eficaz, possivelmente devido ao tipo de cepa do parasita (revisto em Coura & De Castro, 2002). A maior limitação destes compostos é a baixa atividade na fase crônica da doença, prevalente na América Latina (Cançado, 1997). Estes dois nitroderivados apresentam efeitos colaterais sérios, sendo em alguns casos o tratamento temporariamente suspenso ou mesmo abandonado. No caso de nifurtimox incluem anorexia, emagrecimento, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas. No caso de benznidazol incluem dermatites com erupção cutânea, edema generalizado, febre, enfartamento ganglionar, dores articulares e musculares, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (Coura, 1996). Benznidazol tem sido eficaz em casos de reativação da doença de Chagas tanto após transplante de medula (negativação da parasitemia) (Atclas et al., 1999), como em pacientes com AIDS (melhoria das condições clínicas e redução da parasitemia) (Nishioka et al., 1993; Sartori et al., 1998, 2002).



Esquema 1.1. Drogas utilizadas no tratamento clínico da doença de Chagas.

(a) Nifurtimox; (b) Benznidazol

A atividade antiparasitária de nifurtimox resulta da redução metabólica do grupo nitro por nitroredutases gerando radicais nitroanions, altamente reativos, que reagem com oxigênio originando produtos da redução do oxigênio (revisto em Docampo & Moreno, 1986). O *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxicação de metabólitos de oxigênio e deste modo é mais susceptível a estes produtos do que a célula hospedeira (Boveris et al., 1980; Morello, 1988). Recentemente, foram descritas reações de nifurtimox com moléculas que contêm grupamento SH tais como glutatona, cisteína, ácido lipóico e coenzima A. Estas reações podem estar envolvidas nos efeitos observados sobre biomoléculas e/ou enzimas fundamentais para a sobrevivência do parasita, como a tripanotona e ovotiol (Diaz et al. 2004).

O dano oxidativo para o parasita foi descartado como principal mecanismo de ação de benznidazol, pois em concentrações em que o nitroderivado apresentava atividade tripanocida não ocorria estímulo da geração de íon superóxido e de H_2O_2 (Moreno et al., 1982). A ação de benznidazol parece envolver um efeito direto sobre a síntese de macromoléculas por ligação covalente, ou outras interações dos intermediários de nitroredução com componentes celulares (Polak & Richle, 1978; Goijman et al., 1985; Docampo & Moreno, 1986; Diaz de Toranzo et al., 1988). Uma ação inibitória direta de benznidazol foi observada sobre a atividade de DNA topoisomerasas do parasita (Riou et al., 1984), e também sua ligação ao DNA, lipídeos e proteínas de epimastigotas (Diaz de Toranzo et al., 1988). Mais recentemente foi sugerido que o efeito tripanocida do nifurtimox e benznidazol se deve à significativa redução nas concentrações de tripanotona e glutatona causada pela conjugação destes fatores com metabólitos de ambas as drogas (Repetto et al., 1996; Maya et al., 1997). Tratamento das três formas do parasita com butionina sulfoximina, análogo de aminoácido que inibe a síntese de glutatona e tripanotona, mostrou uma redução no teor de tióis livres, levando a sua combinação com nifurtimox ou benznidazol à potenciação do efeito destas drogas (Faundez et al., 2005). Segundo estes autores, a butionina sulfoximina inibe a síntese de glutatona e metabólitos de nifurtimox e benznidazol que se conjugam com tióis livres, levando à redução dos níveis de glutatona e tripanotona reduzidas, resultando no aumento do efeito tóxico das drogas.

1.1.5. Desenvolvimento de novos quimioterápicos

A pesquisa de quimioterápicos alternativos a benznidazol continua intensa, sendo ensaiados vários grupos de compostos testados (revisto em De Castro, 1993; Stoppani, 1999; Coura & De Castro, 2002; Urbina & Docampo, 2003), porém poucos fármacos alcançam a fase de ensaios clínicos. Dentre estes fármacos, destacam-se alopurinol (Tomimori-Yamashita et al., 1997; Apt et al., 1998), cetoconazol (Brener et al., 1993), itraconazol e fluconazol (Apt et al., 2003). O tratamento com benznidazol, seguido da utilização de itraconazol e fluconazol, mostrou significativo sucesso clínico e radiográfico em um paciente com hemofilia que apresentou encefalite tripanosomal multifocal e necrótica após infecção por transfusão de sangue com HIV e *T. cruzi* (Solari et al., 1993).

As indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de drogas contra esta doença, por esses programas serem financeiramente pouco atrativos, especulativos e longos, não sendo justificados com base puramente comercial. Entre as 1393 novas drogas desenvolvidas entre 1975 e 1999, somente 1% foi dirigida para doenças tropicais (Trouiller et al., 2000, 2002).

O avanço do conhecimento da bioquímica básica de *T. cruzi* permitiu a identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas (revisto em Docampo, 2001; Rodriguez, 2001; Coura & De Castro, 2002). Entre eles ressaltamos: enzimas como tripanotona redutase, DNA topoisomerasas, cisteína proteinases (revisto em McKerrow, 1999; Roush et al., 2000; Cazzulo et al., 2001; Cazzulo, 2002), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (revisto em Ullman & Carter, 1997; Eakin et al., 1997; Freymann et al., 2000), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Souza et al., 1998), dihidrofolato redutase (revisto em Zuccotto et al., 1999, 2001; Khabnadideh et al., 2005) e farnesilpirofosfato sintase (revisto em Docampo & Moreno, 2001; Montalvetti et al., 2001), bem como o metabolismo de esteróis (revisto em Urbina, 1997; Sheehan et al., 1999; Urbina et al., 2002). Os estudos sobre topoisomerasas e tripanotona redutase como alvo de novas drogas serão abordadas abaixo, uma vez que se relacionam mais diretamente com o mecanismo de ação biológica de quinonas.

As topoisomerasas desempenham um importante papel em inúmeros processos celulares, que afetam a topologia e a organização do DNA, sendo a topoisomerase II altamente conservada em tripanosomatídeos (Fragoso & Goldenberg, 1992), representando um interessante alvo quimioterápico nesses parasitas (revisto em Das et al., 2004). A topoisomerase II é expressa em epimastigotas, exclusivamente no núcleo, sendo que em tripomastigotas apenas o RNAm foi detectado (Fragoso et al., 1998).

Os inibidores de topoisomerasas aclarubicina, doxorubicina e mitoxantrona apresentaram efeito sobre a forma sanguínea do *T. brucei* semelhante às drogas padrão de ensaios clínicos. A toxicidade observada para a célula de mamíferos durante o tratamento com os três inibidores ocorreu apenas em concentrações 30x maiores que o IC₅₀ para o parasita (Deterding et al., 2005). Sobre *T. cruzi*, vários inibidores das enzimas bacterianas apresentaram atividade, inibindo tanto a proliferação como a metaciclogênese (Kerschmann et al, 1989; Gonzáles-Perdomo et al, 1990). Camptotecina, inibidor de DNA topoisomerase I de eucariotos induziu a quebra de DNA nuclear e mitocondrial em *T. cruzi* (Bodley & Shapiro, 1995). Os inibidores de topoisomerase II novobiocina, ácido nalidíxico e etoposídeo promoveram severas alterações no DNA de cinetoplasto de *T. cruzi*, *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia fasciculata* e *Leishmania amazonensis* (Cavalcanti et al., 2004).

Tripanotona/tripantotona redutase substitui em protozoários da ordem Kinetoplastida o sistema glutatona/glutationa redutase característico de outras células eucarióticas (Krauth-Siegel et al., 2003). O co-fator tripanotona (N1,N8,bis(glutationil)-espermidina) é uma molécula chave do mecanismo de detoxificação dos tripanosomatídeos e da síntese de precursores de DNA (revisto em Augustyns et al., 2001). Esta enzima é dependente de NADPH, o qual mantém a tripanotona na forma reduzida, que poderá ser oxidada pela tripanotona oxidase, levando à redução dos níveis de radicais livres, contribuindo para a manutenção do ambiente redutor intracelular. A determinação do sítio ativo da enzima (Krauth-Siegel et al., 1987) permitiu a busca de inibidores específicos, tendo sido testadas diferentes classes de compostos (revisto em Paulino et al., 2005). Dentre estes

compostos temos: nitroderivados (Henderson et al., 1988; Maya et al., 2003; Aguirre et al., 2004), naftoquinonas (Salmon-Chemin et al., 2001; Zani & Fairlamb, 2003), fenotiazinas (Chan et al., 1998; Gutierrez-Correa et al., 2001; Rivarola & Paglini-Oliva, 2002), 2-amino difenilsulfetos (Girault et al., 1998), derivados de poliaminas (Bonnet et al., 1997; Li et al., 2001), alcalóides (Fournet et al., 1998), complexos de platina (Bonse et al., 2000) e derivados de quinacrina (Saravanamuthu et al., 2004).

1.2. Naftoquinonas

Quinonas são dienonas cíclicas, tendo como característica a capacidade de oxirredução, de fundamental importância em muitos processos biológicos, como reações de fotossíntese e de transferência de elétrons (Burnet & Thomson, 1967; Patai, 1974; Cook, 1984). A principal reação das quinonas é a sua redução a um radical semiquinona, que retorna à sua formação original ao transferir seus elétrons livres a uma molécula ou radical aceptor. Se a molécula for oxigênio, será reduzida a ânion superóxido levando, a seguir, à formação de radical hidroxila, conhecido por causar danos à membranas biológicas e a interferir em diferentes vias biossintéticas (Powis, 1987; Koster, 1991; Monks et al., 1992). Estes compostos são utilizados em estudos de química medicinal, em cujo arsenal encontram-se diversos quimioterápicos quinoidais, como por exemplo os agentes anti-câncer daunorrubicina, doxorrubicina e mitomicina.

Dentre as quinonas encontram-se as naftoquinonas, presentes em diferentes famílias de plantas e que têm sido utilizadas em diversas culturas como corantes em cosméticos e alimentos, além de ter aplicação na medicina, como agentes anti-tumorais, anti-inflamatórios e anti-microbianos (Duke, 1985; Powis, 1987). Muitos destes compostos foram isolados de plantas, bactérias e fungos (Thomson, 1971). A toxicidade de naftoquinonas tem sido bastante estudada *in vitro* (Brunmark & Cadenas, 1989; Comporti, 1989; O'Brien, 1991) e *in vivo* (Munday et al., 1991, 1994, 1995a,b) com fortes evidências que tanto as ações tóxicas como as terapêuticas envolvem a formação de intermediários reativos do oxigênio a partir de um ciclo redox (Hertzberg et al., 1984; Munday, 2000). Este ciclo pode ser iniciado por redução do tipo 1 elétron, levando à formação de semiquinonas, ou 2 elétrons, com formação de hidroquinona. Enquanto no primeiro processo semiquinonas são muito instáveis e reagem rapidamente com oxigênio molecular, o segundo, mediado pela enzima DT-diaforase (NADPH:[aceptor de quinona] oxidoreductase - EC 1.6.99.2), foi proposto como um processo de detoxificação, uma vez que hidroquinonas são menos reativas e através de reações como sulfatação levam a conjugados que são inativos e facilmente eliminados (Powis, 1987; O'Brien, 1991).

1.2.1. Lapachol, α - e β -lapachona

Entre as naftoquinonas bioativas temos o lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona) isolado do lenho de diferentes espécies de *Tabebuia* da família Bignoniaceae, como por exemplo, o pau d'arco e os ipês (Fig. 1.7).

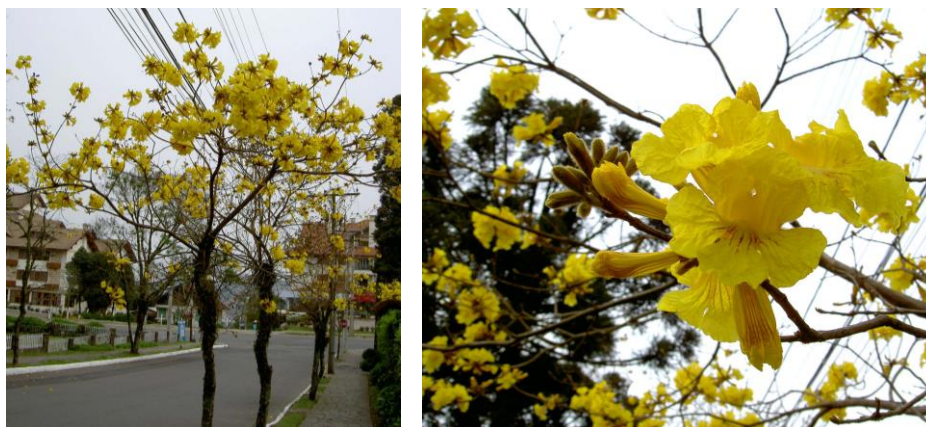
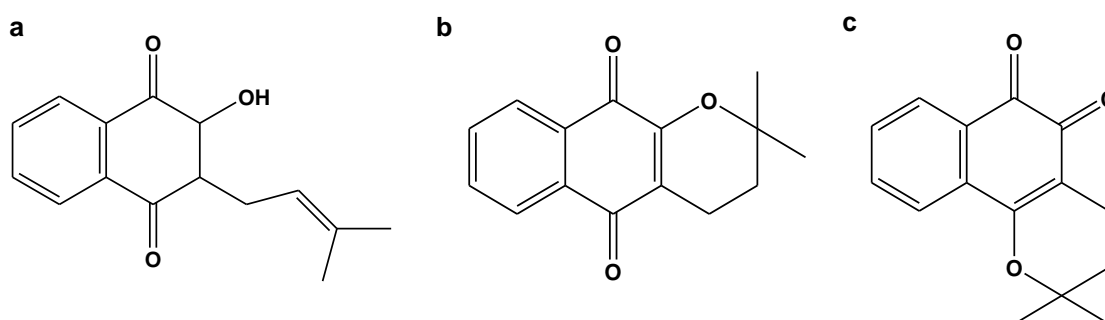


Figura 1.7. Espécime do gênero *Tabebuia*, família Bignoniaceae (ipê).

O lapachol foi a naftoquinona que despertou maior interesse nos pesquisadores, não só por suas importantes propriedades farmacológicas, como também pela sua abundância em várias espécies das famílias Bignoniaceae e Verbenaceae, podendo ser facilmente obtida do lenho de madeiras destas plantas em quantidades que vão de 1 a 4%. Essas famílias são comuns em florestas tropicais e estão presentes em quase todo o Brasil, onde foram descritos mais de 46 tipos de ipês (Bignoniaceae). Na medicina popular, em especial entre populações indígenas da América, ipês são utilizados no tratamento de diferentes doenças, em especial o câncer (Bastien et al., 1983; Arenas, 1987).

Uma característica da reatividade química do lapachol é a facilidade de ciclização da cadeia isoprenil levando à formação da α -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[2,3-*b*]piran,5,10-diona) e da β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-*b*]piran,5,6-diona) (Esquema 1.2). Estas duas quinonas são obtidas como contaminantes no processo de isolamento de lapachol. Este grupo de naftoquinonas de quinonas vem sendo estudado pelo grupo do Dr. Antonio Ventura Pinto no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (UFRJ) desde a década de 70 (Pinto et al., 1977, 1982a,b, 1985, 1987a,b, 1997a,b; Cruz et al., 1977; Lopes et al., 1978; Pinto et al., 1980; Lopes et al., 1984; Lagrota et al., 1986; Ferreira et al., 1987; Chaves et al., 1990; Santos et al., 1992; De Castro et al., 1994; Neves Pinto et al., 1997; Neves Pinto, 1998; Moura et al., 2001).



Esquema 1.2. Naftoquinonas isoladas de *Tabebuia* sp.

(a) lapachol; (b) α -lapachona; (c) β -lapachona.

O primeiro relato de que temos notícia sobre a atividade biológica de lapachol e β -lapachona foi sobre a ação microbicida (Gonçalves Lima et al., 1962, 1971). Desde então foram descritas diferentes atividades destas naftoquinonas tais como: (a) citostática sobre diferentes linhagens tumorais (D'Albuquerque et al., 1972; Consolação et al., 1975; Rao & Kingston, 1982; Houghton et al., 1994; Dinnen & Ebisuzaki, 1997); (b) anti-inflamatória (De Almeida et al., 1990); (c) bactericida e fungicida (D'Albuquerque et al., 1972; Guiraud et al., 1994; Binutu et al., 1996); (d) virucida (Lagrotta et al., 1986; Pinto et al., 1987a; Santos et al., 1992); (e) sobre *Schistosoma mansoni* (Pinto et al., 1977) e a forma adulta e os ovos de *Biomphalaria glabrata* (Santos et al., 2000, 2001; Souza et al., 2004); (f) sobre *Plasmodium falciparum* (Carvalho et al., 1987) e *Plasmodium berghei* (Andrade-Neto et al., 2004). No Brasil, o lapachol é licenciado e comercializado pelo LAFEPE para uso como coadjuvante no tratamento de neoplasias.

β -Lapachona inibiu a atividade da transcriptase reversa nos vírus da mieloblastose em aves, da leucemia Rauscher em murinos (Schürch & Wehrli, 1978) e a transcrição do vírus HIV-1 (Li et al., 1993a). Uma extensa investigação da atividade antitumoral desta quinona vem sendo feita, mostrando a indução de apoptose em diferentes linhagens tumorais (Li et al., 1995; revisto em Tang & Porter, 1997; Dolan et al., 1998; Lai et al., 1998; Planchon et al., 1999, 2001; Manna et al., 1999; Huang & Pardee, 1999; Pink et al., 2000; Don et al., 2001; Tagliarino et al., 2001, 2003; Choi et al., 2002, Choi et al., 2002, 2003; Gupta et al., 2002; Li et al., 2003; Kumi-Diaka et al., 2004; Ough et al., 2005; Park et al., 2005). Mecanismos envolvendo poli(ADP-ribose) polimerase culminam em necrose em células de osteocarcinoma humano (Liu et al., 2002). Em células neoplásicas, esta quinona é um potente inibidor do reparo do DNA provocado por carcinógenos ou radiação (Boothman et al., 1987; Boothman & Pardee, 1989).

Os efeitos anti-viral e apoptótico sobre células tumorais têm sido associados ao fato de β -lapachona ser um inibidor específico de topoisomerasas, envolvidas em processos tais como replicação, transcrição, mitose e reparo (Li et al., 1993b; Frydman et al., 1997; Weller et al., 1997; Chau et al., 1998; revisto em Bailly, 2000; Verma, 2005). Foi demonstrado que β -lapachona inibiu irreversivelmente topoisomerase II, pela sua ligação à enzima na presença de ATP (Krishnan & Bastow, 2000). A apoptose induzida pela β -lapachona em tumores vem sendo associada à diminuição da expressão de Bcl-2, um aumento de Bax, além da ativação de caspases 3 e 9 (Woo & Choi, 2005; Lee et al., 2005), sendo os efeitos citotóxicos desta quinona reduzidos após a inibição de NAD(P)H:quinona oxidoreductase (Park et al., 2005; Ough et al., 2005; Reinickle et al., 2005). Foi proposto por Reinickle e colaboradores (2005) uma via apoptótica nova, independente de caspase e p53, dependente desta enzima. A morte celular independente de p53 já havia sido descrita previamente (Huang & Pardee, 1999). β -lapachona apresentou grande potencial em cânceres específicos com elevados níveis de NAD(P)H:quinona oxidoreductase como mama, pulmão, pâncreas, cólon e próstata. O tratamento com β -lapachona também promoveu a diminuição no nível de ciclooxigenase, além de inibir a atividade da telomerase e modular negativamente a telomerase transcriptase reversa de humanos (Lee et al., 2005).

1.2.2. Atividade sobre tripanosomatídeos

O tratamento de epimastigotas de *T. cruzi* com β -lapachona por 4 h (1,6 a 7,8 μ M)

induziu a geração de radicais livres e a inibição da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, levando a danos irreversíveis, sendo observada uma fragmentação do DNA nuclear e de cinetoplasto (Goijman & Stoppani, 1983, 1985; Goijman et al., 1984). Epimastigotas tratados com esta naftoquinona (40 $\mu\text{M}/3$ h) apresentam radicais livres semiquinona, indicando que o mecanismo de ação do composto envolva o ciclo redox (Docampo et al., 1977, 1978ab). Esse mecanismo da β -lapachona, como de outras α -naftoquinonas foi então estudado através de ensaios bioquímicos espectrofotométricos. A inibição da redução de citocromo c pela superóxido dismutase, diminuindo o consumo de oxigênio no sistema foi observado neste modelo acelular (Molina-Portela et al., 1996). β -Lapachona também mostrou atividade sobre *Crithidia fasciculata* (De Pahn et al., 1988), sendo também observada a geração de radicais livres (Fernández-Villamil et al., 1997). Em homogenato total e em fração mitocondrial de formas epimastigotas de *T. cruzi* foi observada a geração de água oxigenada na presença de β -lapachona, o que não ocorreu com a α -lapachona. Além disso, a concentração de β -lapachona que causava este efeito (4 μM) levava a 95% de inibição da proliferação de epimastigotas (Boveris et al., 1977, 1978; Cruz et al., 1978; Docampo et al., 1978a).

Análises ultra-estruturais de Docampo e colaboradores (1977, 1978b) sobre as três formas do parasita tratadas com β -lapachona (40 $\mu\text{M}/3$ h) apresentavam danos severos especialmente em membranas (nuclear, mitocondrial e plasmática) com formação de "blebs" na plasmática com desaparecimento pontual dos microtúbulos subpeliculares. β -Lapachona ainda induziu uma condensação da cromatina nuclear e um inchaço da mitocôndria. Estudos subseqüentes apenas com epimastigotas mostraram que o tratamento com 40 μM β -lapachona por períodos mais curtos (1 h) já acarreta os efeitos anteriormente descritos (Cruz et al., 1978). Foi demonstrada por esse grupo a geração de radicais livres associada aos demais danos observados, levando a uma posterior lise do parasita.

A atividade de várias naftoquinonas foi testada sobre epimastigotas, sendo que a β -lapachona e alil- β -lapachona inibiram a proliferação na faixa de 8 a 25 μM , cerca de 10x mais ativas que lapachol, enquanto α -lapachona apresentou baixa atividade (Lopes et al., 1978). Camundongos inoculados com tripomastigotas pré-tratados por 1 h/37°C com 250 μM β -lapachona em solução salina não apresentaram parasitemia detectável por exame a microscópio óptico e sobreviveram à infecção. Quando este pré-tratamento era realizado na presença de soro fetal bovino ou de solução de hemoglobina de coelho, com exceção dos ensaios com 3-alil- β -lapachona, o curso da infecção foi semelhante ao do controle. Por espectrometria UV foi observado que a incubação com hemoglobina das quinonas, com exceção de 3-alil- β -lapachona, levava ao desaparecimento de oxihemoglobina e aparecimento de metahemoglobina (Lopes et al., 1978). Resultado semelhante foi reportado em estudos com menadiona (derivado 1,4-naftoquinona), cuja ação sobre epimastigotas é abolida por soro ou sangue (Lopetegui & Sosa, 1961). Esta transformação induzida por menadiona foi descrita como devida à geração de anion superóxido (Goldberg & Stern, 1976). Estes resultados sugerem que estas quinonas sejam inativadas por redução na presença de oxihemoglobina ou pela interação com proteínas séricas. Estudos subseqüentes com 3-alil- β -lapachona mostraram em epimastigotas danos semelhantes aos apresentados por β -lapachona (Docampo et al., 1977), além de aumento na produção de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos, porém a droga foi inativa em infecções experimentais. Ainda sobre epimastigotas, uma naftofurandiona e uma quinolinfurandiona também mostraram

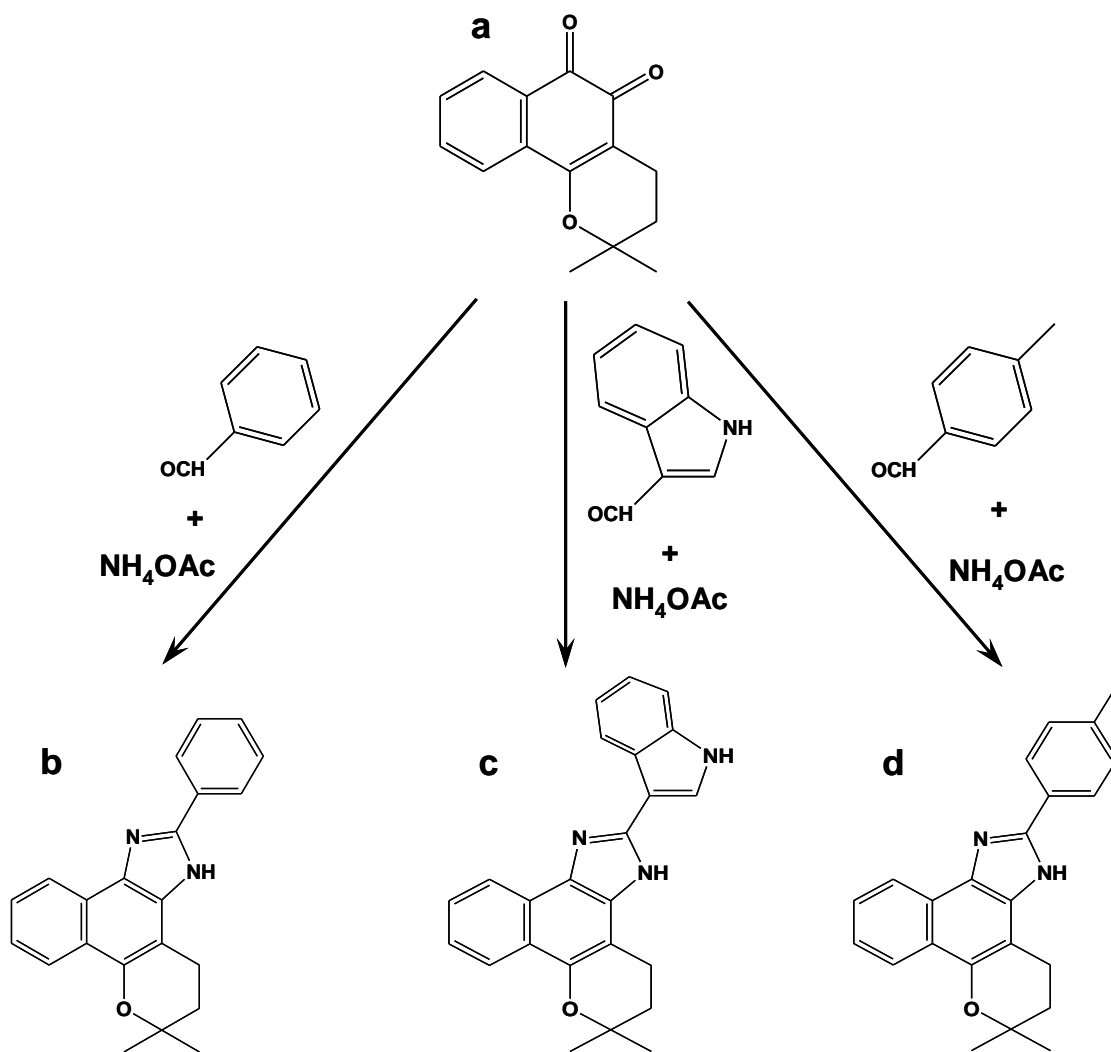
atividade (Tapia et al., 2004).

Vários autores mostraram correlação entre a estrutura da quinona e seu efeito tóxico em tripomastigotas sangüíneos, sendo as naftoquinonas do tipo 1,2 mais ativas que as do tipo 1,4 (Lopes et al., 1978; Goijman & Stoppani, 1985; Pinto et al., 1987b; Goulart et al., 1997). Seu mecanismo de ação sobre tripanosomatídeos, incluindo aí *T. cruzi*, está ligado a sua característica de participar de reações redox e gerar radicais livres de oxigênio (Boveris et al., 1977; Cruz et al., 1978; Docampo et al., 1978b; Molina Portela et al., 1996).

Outras quinonas naturais isoladas de vegetais como *Rubia tinctorum* (Rubiaceae), *Rheicia gardneriana* (Clusiaceae) e *Calceolaria sessilis* (Scrophulariaceae) também foram ativas sobre *T. cruzi* (De Castro et al., 1994; Morello et al., 1995; Alves et al., 1999; Brengio et al., 2000). O sesquiterpeno nerolidol inibiu a proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, além de amastigotas de *L. amazonensis*, sendo o mecanismo de ação associado à inibição da biossíntese de isoprenóides. O tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* resultou em uma redução de 95% da infecção. *In vivo*, nerolidol levou a uma redução do tamanho das lesões em camundongos (Arruda et al., 2005).

1.2.3. Derivados de β -lapachona

A partir do início da década de 90, nosso grupo iniciou colaboração com o Dr. Antônio Ventura Pinto (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais/UFRJ) desenvolvendo estudos sobre a atividade tripanocida de compostos naturais e seus derivados sintéticos (De Castro et al., 1994). Foram sintetizadas séries de derivados heterocíclicos através da reação de naftoquinonas com reagentes comuns da química heterocíclica, originando derivados oxazólicos, imidazólicos, fenoxazólicos e fenazínicos que tiveram sua atividade testada sobre tripomastigotas de *T. cruzi* (Pinto et al., 1997a; Neves-Pinto et al., 2000, 2002; Moura et al., 2001). Dentre estes compostos três derivados naftoimidazólicos: 4,5-dihidro-6,6-dimetil-6H-2-fenil-piran[*b*-4,3]naft[1,2-d]imidazol (**N1**), 3,4-dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-indolil)-piran[*b*-4,3]naft[1,2-d]imidazol (**N2**) e 4,5-dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-metilfenil)-piran[*b*-4,3]nafto[1,2-d]imidazol (**N3**) foram os mais ativos sobre o parasita, tendo todos um grupo aromático ligado ao anel imidazólico (Esquema 1.3, Tabela 1.1).



Esquema 1.3. Síntese dos naftoimidazóis a partir da (a) β -lapachona.
(b) N1, (c) N2 e (d) N3.

Tabela 1.1. Atividades de naftoquinonas naturais e derivados sobre formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*^a

composto	IC ₅₀ /1d (µM)
Quinonas	
2-Hidroxi-1,4-naftoquinona (<i>lapachol</i>)	410,8 ± 53,5
2,2-Dimetil-3,4-dihidro-5,6-dioxi-2H-nafto[1,2-b] pirano (<i>β-lapachona</i>)	391,5 ± 16,5
2,2-Dimetil-4,5-dioxi-2-hidro-nafto[1,2-b] furano (<i>nor-β-lapachona</i>)	>4800
3,4-Dihidro-2,2-dimetil-5,10-diona-2H-nafto[2,3-b] pirano (<i>α-lapachona</i>)	>4800
3-(3'-Metil-2'-butenil)-2-metoxil-1,4-naftoquinona (<i>metoxi-lapachol</i>)	164,8 ± 30,5
3-Hidroxy-3-12'-metil-1'-propenil)-1,4-naftoquinona (<i>nor-lapachol</i>)	1280,6 ± 167,2
2-Hidroxi-1,4-naftoquinona (<i>lawsone</i>)	>2500
2-Aliloxi-1,4-naftoquinona (<i>O-alil-lawsone</i>)	420,7 ± 71,2
3-Alil-2-hidroxi-1,4-naftoquinona (<i>C-alil-lawsone</i>)	330,7 ± 62,4
Naftooxazólicos	
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-pirano[2',3',4-3]nafto[2,1-d] oxazol	325,2 ± 21,3
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-fenil-pirano[2',3'-4-3]nafto[1,2-d] oxazol	283,5 ± 25,0
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-hidroxifenil)-pirano[2',3'-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	>9600
6,6-Dimetil-4,5-dihidro-6H-2-(4'-metoxifenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	3502,5 ± 305,3
6,6-Dimetil-4,5-dihidro-6H-2-(2'-acetoxifenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	1641,3 ± 147,0
6,6-Dimetil-4,5-dihidro-6H-2-(3',4'-metilenedioxi)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	269,5 ± 46,5
6,6-Dimetil-4,5-dihidro-2-(n-propil)-6H-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	351,4 ± 12,4
2-Carboxy-4,5-dihidro-6,6-dimetil-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	>4800
5,5-Dimetil-4-hidroxi-furano[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	>2500
5,5-Dimetil-2-(2'-hidroxifenil)-4-hydrofuran[b-4,3]nafto[1,2-d] oxazol	>2500
5-Hidroxi-4-(2'-metil-1'-propenil)-nafto[1,2-d] oxazol	>2500
4-(2'-Metil-1'-propenil)-5-metoxinafto[1,2-d] oxazol	49,5 ± 1,4
5-Hidroxi-4-(2'-metil-1'-propenil)-2-fenil-nafto[1,2-d] oxazol	171,9 ± 51,2
2-Fenil-4-(3'-metil-1'-propenil)-5-metoxinafto[1,2-d] oxazol	197,3 ± 25,8
Naftoimidazólicos	
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-fenil-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol (N1)	37,0 ± 0,7
3,4-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-indolil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol (N2)	15,4 ± 0,2
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-metilfenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol (N3)	15,5 ± 2,9
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-metilfenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	37,5 ± 12,8
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-metilfenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	90,8 ± 5,8
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-metoxifenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	259,3 ± 40,4
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-metoxifenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	3057,8 ± 836,7
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-metoxifenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	6445,6 ± 483,7
3,4-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-nitrofenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	303,6 ± 12,2
3,4-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-nitrofenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	579,3 ± 52,5
3,4-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-nitrofenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	1858,1 ± 366,7
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-fluorofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	98,0 ± 4,8
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-fluorofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	372,0 ± 38,7
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-fluorofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	243,3 ± 24,9
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-clorofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	2286,3 ± 421,1
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-clorofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	1064,2 ± 261,6
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-clorofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	39,4 ± 8,1
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-bromofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	84,9 ± 3,2
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-bromofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	147,8 ± 12,5
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-bromofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	2004,0 ± 622,9
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-cianofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	1095,9 ± 92,9
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-cianofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	518,5 ± 78,9
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-cianoefenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	>8000
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3'-trifluorometilfenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	128,7 ± 29,4
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-trifluorometilfenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	448,0 ± 55,7
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(4'-trifluorometilfenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	227,5 ± 58,0
3,4-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3',4'-metilenedioxi)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	1850,5 ± 241,1
5,5-Dimetil-4-hidro-2-(2'-hidroxifenil)-furan[b-4,3]nafto[2,1-d] imidazol	4455,5 ± 465,8
4,5-Dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(2'-hidroxi-5'-nitrofenil)- pirano[b-4,3]nafto[1,2-d] imidazol	>8000
Fenoxazina, indol, ciclopentenos, piranos	
6-(3'-Metil-2-butenil)-benzo[e]-5oxa-2H-nafto[2,1-b] fenoxazina	>4000
3H,11H-3a,7a-Dihidroxi-10-metil-benzo[6,7]pirano[b-5,4] indol	1216,7 ± 349,1
5H-7-Carboxietil-9,9-dimetil-4b-hidroxi-8-hidro-6-oxa ciclopenta[3,4]nafto[1,2-b] furano	>4000
5H,10H-7-Acetil-10,10-dimetil-8,9-dihidro-4b-hidroxi-6-oxa ciclopenta[3,4]nafto[1,2-b] pirano	>4000
5H,10H-7-Carboxietil-10,10-dimetil-8,9-dihidro-4b-hidroxi-6-oxa ciclopenta[3,4]nafto[1,2-b] pirano	56,1 ± 15,5
2H,7H-3-Acetoxi-4-acetil-5,6-dihidro-7,7-dimetil-pirano[b'-1,2]	>4000
5H-7-Acetil-5-dihidro-9,9-dimetil-8-hidro-6-oxa ciclopenta[3,4] nafto[1,2-b] furano	>4000
5H-10H-7-Acetil-5-dihidro-8,9-dihidro-10,10-dimetil-6-oxa ciclopenta [3,4]nafto[1,2-b] pirano	786,9 ± 80,0

^a Pinto et al., 1997; Neves-Pinto et al., 2000; Moura et al., 2001, 2004

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos desta tese são:

1. Analisar *in vitro* o efeito dos derivados naftoimidazólicos de β -lapachona **N1**, **N2** e **N3** sobre as diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* (epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas sanguíneas);
2. Investigar o mecanismo de ação de **N1**, **N2** e **N3** sobre epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* através das técnicas de microscopia eletrônica, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

3. ARTIGO 1

No **Artigo 1** foi investigado o efeito *in vitro* do derivado naftoimidazólico da β -lapachona **N1** sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, além de identificados possíveis alvos envolvidos no mecanismo de ação deste composto sobre o parasita.

Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. J Antimicrob Chemother 2005;56:1034-1041.

4. ARTIGO 2

Em estudos anteriores, os naftoimidazóis **N1**, **N2** e **N3** foram caracterizados como os mais ativos sobre tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo sugerido o mecanismo de ação de **N1** no **Artigo 1**. No presente trabalho (**Artigo 2**), a investigação foi estendida para os outros dois naftoimidazóis.

Menna-Barreto RFS, Pinto MCFR, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. Naphthoimidazoles from β -lapachone: a new class of derivatives active against *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents 2006. (Submetido à publicação).

**Submissions Being Processed for Author Solange Lisboa de Castro, PhD**

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission	IJAA-D-06-00006	Naphthoimidazoles from β -lapachone: a new class of derivatives active against <i>Trypanosoma cruzi</i>	Jan 05, 2006	Jan 06, 2006	With Editor

[Back to Main Menu](#)

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.



Naphthoimidazoles from β -lapachone: a new class of derivatives active against *Trypanosoma cruzi*

Rubem F. S. Menna-Barreto¹, Maria do Carmo F. R. Pinto², Antônio V. Pinto², Maurilio J. Soares¹ and Solange L. De Castro^{1,*}

¹*Dept. de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;* ²*Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, β -lapachone, naphthoquinones, naphthoimidazoles, *Tabebuia*

Running title: Activity of naphthoimidazoles against *Trypanosoma cruzi*

*Corresponding author. Mailing address: Dept. de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: 0055 21 2598-4624. Fax: 00 55 21 2260-4434. E-mail: solange@ioc.fiocruz.br

Abstract

From the reaction of naphthoquinones isolated from *Tabebuia sp.* with aldehydes, 60 derivatives were synthesized and assayed against *T. cruzi* trypomastigotes, and one of the most active was the naphthoimidazole N1 that had its mechanism of action suggested previously. Here we extend our investigation to the two other naphthoimidazoles.

N2 and N3 were active against bloodstream trypomastigotes, culture epimastigotes, tissue culture-derived amastigotes and intracellular amastigotes. Treatment of epimastigotes with N2 and N3 induced morphological alterations such as mitochondrial swelling, Trans Golgi Network disruption and disorganization of reservosomes, but did not interfere with transferrin-gold labelling of endocytic compartments. Endoplasmic reticulum profiles were also observed surrounding organelles. In treated trypomastigotes, mitochondrial swelling, plasma membrane blebs and abnormal chromatin condensation were observed. Both naphthoimidazoles also inhibited the succinate cytochrome c reductase activity. Flow cytometry and fluorescence microscopy results confirmed alterations in mitochondrion and acidic compartments of epimastigotes and trypomastigotes. The derivatives N1, N2 and N3 inhibited metacyclogenesis.

The mode of action of the naphthoimidazoles N2 and N3 on *T. cruzi* epimastigotes involves organelles such as mitochondrion, reservosomes and Golgi complex. In bloodstream forms, mitochondrion, acidic compartments, plasma membrane and chromatin are susceptible to treatment.

1. Introduction

β -Lapachone is a naphthoquinone isolated from the heartwood of *Tabebuia sp.* trees (Bignoniaceae), which are abundant in tropical rain forests. The activity of this quinone against viruses, pathogenic microorganisms and tumoral lineages has been already described [1], and it has been considered as a potential compound for clinical application in cancer therapy [2,3]. In a continued effort for the utilization of naturally occurring quinones we have been exploring the reactivity of quinoidal carbonyls towards nucleophilic reagents [4-8]. The reaction of naphthoquinones with aromatic or aliphatic aldehydes, in the presence of ammonium acetate, led to the synthesis of 60 derivatives, comprising mostly naphthoimidazoles and naphthooxazoles, whose activity against *Trypanosoma cruzi* has been determined [1,9-11]. This flagellate protozoan is the causative agent of Chagas' disease, which affects about 15 million people in Latin America [12], and there is intense research aiming new drugs to replace the nitroderivative benznidazole for the treatment of chagasic patients [13].

It has been shown that naphthoimidazoles containing aromatic appendages obtained from β -lapachone are derivatives with high trypanocidal effect [1,9]. One of these compounds (named N1), with a phenyl group linked to the naphthoimidazole moiety, was active against all three forms of *T. cruzi*, targeting mitochondrion and reservosomes in epimastigotes and mitochondrion and DNA in trypomastigotes.¹⁴ In the present work we extend our investigation to two other naphthoimidazoles, N2 and N3, which in the initial screening also presented high activity against bloodstream trypomastigote forms [9,11]. Furthermore, we analyse the effect of all three derivatives on metacyclogenesis and on the compartments of the endocytic pathway.

2. Materials and Methods

2.1. Parasites

Culture epimastigote forms were maintained at 28°C in LIT medium [15] and harvested during the exponential phase of growth. Bloodstream trypomastigotes were obtained from infected albino Swiss mice at the peak of parasitaemia. Extracellular amastigotes were collected from the supernatant of trypomastigote-infected J774G-8 macrophage cultures [16]. The Y strain of *T. cruzi* [17] was used in all experiments, except for the metacyclogenesis assays, which were performed with the Dm28c clone [18].

2.2. Synthesis of the naphthoimidazoles

The compounds were obtained from the reaction of acetic acid diluted β -lapachone with 3-indolylaldehyde or 4-methylbenzaldehyde, in the presence of ammonium acetate. The reactional mixture was refluxed and after precipitation in water, it was purified by column chromatography and recrystallisations in hexane/ethyl acetate (9:1 v/v) [9,11]. Physical and spectral analysis characterized the substances as 4,5-dihydro-6,6-dimethyl-6H-2-(3'-indolyl)-pyran[*b*-4,3]naphth[1,2-d]imidazole (N2) and 4,5-dihydro-6,6-dimethyl-6H-2-(4'-methylphenyl)-pyran[*b*-4,3]naphth[1,2-d]imidazole (N3) (Figure 1). Chemical characterization and trypanocidal activity of 4,5-dihydro-6,6-dimethyl-6H-2-(phenyl)-pyran[*b*-4,3]naphth[1,2-d]imidazole (N1) was presented elsewhere [10,14]. Stock solutions of the naphthoimidazoles were prepared in dimethylsulfoxide (Merck, Darmstadt, Germany).

2.3. Direct effect on *T. cruzi*

Trypomastigotes and culture-derived amastigotes were resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DME) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% foetal calf serum

(DMES). An aliquot of 100 μL (10^6 parasites) was added to the same volume of N2 or N3, previously prepared at twice the desired final concentrations in 96-well microplates (Nunc Inc., Naperville, IL, USA) and incubated at 37°C for 1 day. Alternatively, experiments with trypomastigotes were performed in mouse blood, as previously described [14]. The effect of the naphthoimidazoles on the proliferation of epimastigotes in LIT medium was monitored during 4 days in 24-well plates at 28°C. Cell counts were performed in Neubauer chamber and the activity of N2 or N3 was expressed as IC_{50} , corresponding to the concentration that leads to 50% parasite lysis.

2.4. Effect on intracellular amastigotes in peritoneal macrophages in vitro

Swiss mice peritoneal macrophages were resuspended in DME, added to 24-well plates (Nunc Inc., Naperville, IL, USA) (10^5 cells/well) and maintained for 1 day at 37°C. The cultures were then washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and infected with bloodstream trypomastigotes (ratio 10:1 parasites/host cell). After 2 h of interaction the non-internalised parasites were removed by washing the cultures with DME. Fresh DMES with or without the naphthoimidazoles (5.0 – 10.0 μM) was added and then changed every two days. The infection levels were quantified during 4 days, using a Zeiss Axioplan light microscope (Oberkochen, Germany).

2.5. Effect on metacyclogenesis

Culture epimastigote forms (clone Dm28c) were harvested from the LIT medium, incubated for 4 h in artificial triatomine urine (TAU) [19] and then resuspended in TAU supplemented with 10 mM L-proline, 50 mM sodium glutamate and 2 mM sodium aspartate (TAU3AAG) in the presence or absence of N1, N2 or N3 (0.5 - 3.0 μM). The

number of epimastigotes and trypomastigotes in the supernatant was counted during 4 days of incubation, as previously reported [20].

2.6. Effect at the ultrastructural level

Epimastigotes and trypomastigotes were treated for 1 day with N2 or N3 in the range of 10 to 30 μM and then processed for ultrastructural analysis. For scanning electron microscopy, the parasites were adhered to 0.1% poly-L-lysine-coated coverslips, fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for 40 min and post-fixed with a solution of 1% OsO_4 , 0.8% potassium ferricyanide and 2.5 mM CaCl_2 in the same buffer for 20 min. The cells were dehydrated in an ascending acetone series, dried by the critical point method with CO_2 , the coverslips were mounted with silver cellotape on aluminium stubs, coated with a 20 nm-thick gold layer and then examined in a Zeiss DSM940 microscope.

For transmission electron microscopy, after washing in PBS the parasites were fixed, post-fixed and dehydrated as described above and embedded in Poly/Bed 812 resin (Polysciences, Warrington, PA, USA). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss EM10C microscope.

To analyse the early endocytic compartment susceptibility, epimastigotes treated with N1, N2 or N3 for 1 day and control parasites were incubated with gold-labelled transferrin for 10 min, fixed and then processed for transmission electron microscopy.

2.7. Effect on mitochondrion and acidic compartments

The parasites (5×10^6 cells/mL) were treated for 1 day with N2 or N3, epimastigotes in LIT medium at 28°C and trypomastigotes in DMES at 37°C. Thereafter, the parasites were incubated with 30 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide (PI) plus 10 $\mu\text{g/mL}$ rhodamine 123 (Rh123), or else with 10 $\mu\text{g/mL}$

acridine orange (AO) for 15 min. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired in the regions previously established as those corresponding to each form of *T. cruzi*. Alterations in the fluorescence for Rh123 or AO were quantified using an index of variation (IV) obtained by the equation $(TM - CM) / CM$, where TM is the median of fluorescence for treated parasites and CM that of the control.

Epimastigotes treated with the naphthoimidazoles and labelled with PI/Rh123 or with acridine orange, as described above, were washed in PBS and added to 0.01% gelatin-coated glass coverslips for 15 min at 28°C. Image acquisition was performed with a Zeiss ZVS47 video camera and processed using the software Adobe Premiere 6.0 (Adobe Systems Inc., Chicago, IL, USA).

2.8. Effect on succinate cytochrome c reductase activity

Untreated and treated epimastigotes (30 μ M N2 or N3 / 1 day, 28°C) were washed in PBS, resuspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and disrupted on ice by sonication as previously described [14]. Protein concentration was determined by a commercial protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and succinate cytochrome c reductase activity was measured according to the literature [21]. The reaction mixture contained 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4), 0.003 M EDTA (pH 7.4), 0.6 M succinic acid adjusted to pH 7.4 with NaOH and 0.001 M cytochrome c. The specific activity was measured at 30°C following the reduction of the substrate using a 550 nm filter.

3. Results

3.1. Effect against *T. cruzi* evolutive forms

Treatment of N2 and N3 was effective against bloodstream trypomastigotes, culture epimastigotes, tissue culture-derived amastigotes and intracellular amastigotes, with IC_{50} ranging from 6.5 to 36 μ M after 1 day treatment (Table 1). Higher IC_{50} values (61.6 μ M for N2; 68.3 μ M for N3) were obtained when the trypomastigotes were incubated in the presence of blood. Treatment of culture epimastigotes and intracellular amastigotes with the naphthoimidazoles resulted in a time- and dose dependent inhibitory effect (Figures 2 and 3). As judged by light microscopy, the compounds caused damage to macrophages only above 100 μ M.

After 4 days, the differentiation of epimastigotes to trypomastigotes in TAU3AAG medium was inhibited by all three compounds (Figure 4). The corresponding $IC_{50/4d}$ values were 0.35 ± 0.01 μ M (N1), 0.48 ± 0.06 μ M (N2) and 0.66 ± 0.08 μ M (N3). The range of naphthoimidazole concentration used did not interfere with the total number of parasites (data not shown).

3.2. Ultrastructural analysis

Scanning electron microscopy (SEM) demonstrated that treatment of epimastigotes with N2 and N3 induced body retraction (Figure 5), while in the bloodstream form body torsion was the only morphological alteration observed (Figure 6).

Transmission electron microscopy (TEM) of epimastigotes and trypomastigotes treated with N2 or N3 showed mitochondrial swelling and abnormal chromatin condensation (Figures 5 and 6). Epimastigotes also presented disorganization of reservosome morphology and alterations of the Golgi complex, especially in Trans Golgi Network cisternae. Endoplasmic reticulum profiles were observed surrounding reservosomes, mitochondrion or cytoplasmic membrane figures (Fig. 5). Treated trypomastigotes presented concentric membranar structures inside the mitochondrion and disruption in the kDNA network. Formation of plasma membrane blebs was also induced by the

naphthoimidazoles (Fig. 6).

Epimastigotes treated with N1, N2 or N3 and then incubated with transferrin-gold for 10 min revealed the same pattern of marker localization in early compartments of the endocytic pathway as in control parasites.

3.3. Flow cytometry, fluorescence microscopy and biochemical analysis

Epimastigotes and trypomastigotes treated with N2 or N3 and then incubated with Rh123 or AO showed by flow cytometry a decrease in fluorescence of both markers (Fig. 7). Such decrease was quantified by the arbitrary unit IV; negative values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane (Rh123) or increase in pH of acidic compartments (AO) (Tables 2 and 3). Labeling with propidium iodide of epimastigotes treated with 25 to 35 μM N2 or N3, or of trypomastigotes treated with 2.5 to 7.5 μM N2 or N3, induced a percent of positive parasites similar to that of the corresponding controls. In both cases, confirming the flow cytometry data, a lower fluorescence level was observed in treated parasites by fluorescence microscopy (data not shown).

Treatment of epimastigotes with 30 μM of the naphthoimidazoles for 1 day led to a reduction in the activity of succinate cytochrome c reductase of $16.6 \pm 0.8 \%$ and $42.3 \pm 4.3 \%$, for N2 and N3 respectively, in comparison to untreated parasites.

4. Discussion

Several derivatives were synthesized from β -lapachone and among them the naphthoimidazoles N1, N2 and N3 presented the highest activity against *T. cruzi* [1,9-11]. Our data showed that N2 and N3 were active against *T. cruzi* trypomastigotes, but the presence of blood in the assays led to a 5-fold decrease in activity for N2 and a 2.4-fold decrease for N3. The factors involved in this inactivation have not been yet

determined. It is possible that blood DT-diaphorase converts naphthoimidazoles to non-toxic compounds, or else that the interaction with serum proteins reduces the amount of free compounds, as already described for naphthoquinones [22,23]. However, the possibility that other deactivation mechanisms are occurring can not be ruled out, requiring subsequent investigations.

The vertebrate forms of *T. cruzi* (trypomastigotes and amastigotes) were more susceptible to N2 and N3 than epimastigotes, as also observed for N1. The susceptibility of intracellular amastigotes to N2 and N3 was, respectively, 17- and 14-fold higher than that of the host mammalian cells. These *in vitro* results motivate further experiments with infected mice.

Ultrastructural analysis of epimastigotes and trypomastigotes treated with N2 or N3 revealed abnormal chromatin condensation and mitochondrial damage. Trypomastigotes also presented disruption in the kDNA network, formation of membranar structures inside the mitochondrion and blebs at the plasma membrane. It is known that naphthoquinones such as β -lapachone and its derivatives exert a trypanocidal action through oxidative stress [24-26]. The products of the redox cycling are reactive oxygen species, which lead to lipid peroxidation and consequent membrane alterations. Furthermore, treated epimastigotes presented well-developed endoplasmic reticulum profiles close to organelles such as reservosomes and the mitochondrion, suggesting the involvement of autophagic events in the mechanism of action of these compounds.

Experiments with transferrin-gold were performed to investigate whether the endocytic pathway could be a target of the naphthoimidazoles. Incubation of epimastigotes with the marker showed that vesicles involved in early events of endocytosis were not affected by N1, N2 or N3 (data not shown). However, our observations showed morphological alterations in

the reservosomes (pre-lysosomal compartments). Our data suggest that these compounds interfere in the endocytosis process only at the reservosomes level. These organelles are rich in proteases and appear to be the main energy source for the process of metacyclogenesis [27,28]. Since all three naphthoimidazoles blocked the differentiation of epimastigotes to trypomastigotes at concentrations that did not affect parasite viability, our results strongly suggest that inhibition of metacyclogenesis is consequence of damage to reservosomes.

In order to confirm the data on damage to reservosomes and mitochondrion obtained by TEM, treated parasites were analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy using AO or Rh123. Treatment of epimastigotes and trypomastigotes with N2 or N3 induced a decrease in fluorescence of acridine orange, a marker used to label acidic compartments in trypanosomatids [29-31]. In epimastigotes, this decrease corresponded to an effect on reservosomes, confirming electron microscopy results. In trypomastigotes, where reservosomes are absent [32], acridine orange labelling occurred mostly in acidocalcisomes [33]. As treatment with naphthoimidazoles affects the mitochondrial energetic metabolism, the hydrolysis of polyphosphate and pyrophosphate, present in high content in acidocalcisomes [33], could represent an alternative energy supply for trypomastigotes [31]. For N2 and N3, the electron density pattern of acidocalcisomes was morphologically similar to that of untreated parasites. Since the morphological detection of acidocalcisomes varies depending on the electron microscopy processing [33], further biochemical studies must be performed to confirm whether acidocalcisomes are targets of naphthoimidazoles.

In treated epimastigote and trypomastigote forms the reduction of Rh123 fluorescence was not caused by plasma membrane permeabilisation, since the percent of PI positive cells was similar in both control and treated parasites. The

concentration of N2 and N3 needed to interfere with the mitochondrial potential in trypomastigotes was in a range about the half of the IC₅₀. These data, together with the observed ultrastructural damage at the kDNA network, suggest that the mitochondrion of bloodstream trypomastigotes is more susceptible to the treatment than that of epimastigotes. Inhibition of succinate cytochrome c reductase activity in epimastigotes suggests that naphthoimidazoles compromise the energetic metabolism of the parasites, and reinforces that the mitochondrion is a target of N2 and N3, as previously described for N1 [14].

Naphthoquinones such as β -lapachone can generate free radicals [24,25], although the structures of derivatives N2 and N3 do not endow this capacity. Nevertheless, in the present work it was shown that mitochondrion, acidic compartments (especially reservosomes in epimastigotes) and Golgi complex are susceptible to the treatment with N2 and N3. Marked alterations in chromatin pattern and kDNA network were also observed. The planar structure of N1, N2 and N3 encourages us to study the mechanism of interaction between naphthoimidazoles and *T. cruzi* DNA, and their role in parasite death.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq and FIOCRUZ. The authors thank Marcos Meuser for the excellent technical work and Elaine Motta da Costa for her help in parasite-host cell interaction experiments. We are also very grateful to Dr. José A. Morgado-Diaz (INCA/RJ) for his support on mitochondrial enzymatic activity assays.

References

- [1] Moura KCG, Emery FS, Neves-Pinto C *et al.* Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives: A review from an interdisciplinary study. *J Braz Chem Soc* 2001; **12**: 325-38.
- [2] Dubin M, Fernandez Villamil SH, Stoppani AO. Cytotoxicity of β -lapachone, a naphthoquinone with possible therapeutic use. *Medicina* 2001; **61**: 343-50.
- [3] Li YZ, Sun XG, LaMont JT *et al.* Selective killing of cancer cells by β -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *Proc Natl Acad Sciences USA* 2003; **100**: 2674-78.
- [4] Ferreira VF, Pinto AV, Pinto MCFR *et al.* Selective aromatic reduction in pyranonaphthoquinone systems. *J Chem Res* 1987; Supl: 26.
- [5] Chaves JP, Pinto MCFR, Pinto AV. Heterocyclics from quinones. I - Reaction of lapachol with primary alkyl amines. *J Braz Chem Soc* 1990; **1**: 21-7.
- [6] Pinto AV, Ferreira VF, Pinto MCFR *et al.* Reaction of 2-amino-1,4-naphthoquinone derivatives with dimethyl acetylenedicarboxylate. *Synthetic Comm* 1985; **15**: 1181-9.
- [7] Pinto AV, Neves-Pinto C, Pinto MCFR *et al.* Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones. *Heterocycles* 1997a; **45**: 2431-6.
- [8] Neves-Pinto C, Pinto MCFR, Emery FS *et al.* Synthesis of some naturally occurring naphthoquinones from *Paratecoma* and *Tabebuia* sp. *An Acad Bras Cien* 1997; **69**: 15-8.
- [9] Moura KCG, Salomão K, Menna-Barreto RFS *et al.* Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazoles from β -lapachone. *Eur J Med Chem* 2004; **39**: 639-45.
- [10] Pinto AV, Neves-Pinto C, Pinto MCFR *et al.* Trypanocidal activity of synthetic heterocyclic derivatives of active quinones from *Tabebuia* sp. *Arzneimittel-Forsch* 1997b; **47**: 74-9.
- [11] Neves-Pinto C, Dantas AP, De Moura KC *et al.* Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneimittel-Forsch* 2000; **50**: 1120-8.
- [12] Vinhaes MC, Schofield CJ. Trypanosomiasis control: surmounting diminishing returns. *Trends Parasitol* 2003; **19**: 112-3.
- [13] Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; **97**: 3-24.
- [14] Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV *et al.* Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicrob Chemother* 2005; in press.
- [15] Camargo EC. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964; **6**: 93-100.
- [16] De Castro SL, Meirelles MNL. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell "in vitro". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; **82**: 209-18.
- [17] Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 1953; **20**: 191-208.
- [18] Contreras VT, Salles JM, Thomas N *et al.* In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; **16**: 315-27
- [19] Contreras VT, Araújo-Jorge TC, Bonaldo MC *et al.* Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; **83**: 123-33.
- [20] Santa-Rita RM, Santos Barbosa H, Meirelles MN *et al.* Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2000; **75**: 219-28.
- [21] Masters BS, Williams Jr CH, Kamin H. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome *c* reductase from pig liver. In: Estrabrook RW & Pullman ME, ed.

- Methods in Enzymology* (vol 10). New York: Academic Press 1967; 565-73.
- [22] Lopes JN, Cruz FS, Docampo R *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; **72**: 523-31.
- [23] Munday R. Autoxidation of naphthoquinones: effects of pH, naphthoquinones and superoxide dismutase. *Free Rad Res* 2000; **32**: 245-53.
- [24] Molina Portela MP, Fernandez Villamil SH, Perissinotti LJ *et al.* Redox cycling of *o*-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**: 1875-82.
- [25] Boveris A, Docampo R, Turrens JF *et al.* Effect of β -lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1978; **175**: 431-9.
- [26] Renou SG, Asis SE, Abasolo MI *et al.* Monoarylhydrazones of α -lapachone: synthesis, chemical properties and antineoplastic activity. *Pharmazie* 2003; **58**: 690-5.
- [27] Figueiredo RCBQ, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol* 2000; **86**: 1213-8.
- [28] Figueiredo RCBQ, Rosa DS, Gomes YM *et al.* Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. *Parasitology* 2004; **129**: 431-8.
- [29] Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; **94** (Suppl 1): 139-41.
- [30] Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K *et al.* *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur J Cell Biol* 2000; **79**: 858-69.
- [31] Docampo R, Moreno SNJ. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 2001; **114**: 151-9.
- [32] Soares MJ, De Souza W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1991; **77**: 461-8.
- [33] Docampo R, De Souza W, Miranda K *et al.* Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nature Rev* 2005; **3**: 251-61.

Table 1. IC₅₀ values / 1d (μM) for the effect of naphthoimidazoles against *T. cruzi*

	Trypomastigotes		Epimastigotes	Amastigotes	
	0% blood	100% blood		extracellular ^a	intracellular ^b
N2	12.3 ± 1.2 ^c	61.6 ± 3.6	36.0 ± 1.9	12.4 ± 1.9	6.5 ± 1.0
N3	28.2 ± 0.9	68.3 ± 7.3	30.7 ± 3.6	9.7 ± 0.2	7.2 ± 0.2

^aTissue-cultured derived amastigotes.

^bNumber of amastigotes / 100 peritoneal macrophages.

^cMean ± standard deviation of at least 3 independent experiments.

Table 2. Flow cytometry analysis of *T. cruzi* epimastigotes^a treated with N2 and N3 and then labelled with Rh123 or AO

μM	compound	Rh123		AO	
		Median	IV ^b	Median	IV
0	-	406.8	0.00	128.6	0.00
25	N2	198.1	-0.51	83.5	-0.35
	N3	115.5	-0.72	72.3	-0.44
30	N2	124.1	-0.69	72.3	-0.44
	N3	143.3	-0.65	47.0	-0.63
35	N2	97.1	-0.76	67.1	-0.48
	N3	107.5	-0.74	45.3	-0.65

^aTreatment in LIT medium for 1 day at 28°C.

^bIV= (MT–MC)/MC, where MT corresponds to the median of the fluorescence for treated parasites and MC to that of control parasites.

Table 3. Flow cytometry analysis of *T. cruzi* trypomastigotes^a treated with N2 and N3 and then labelled with Rh123 or AO

μM	compound	Rh123		AO	
		Median	IV ^b	Median	IV
0.0	-	542.5	0.00	866.0	0.00
2.5	N2	264.2	-0.51	283.4	-0.67
	N3	220.7	-0.59	697.8	-0.19
5.0	N2	254.8	-0.53	191.1	-0.78
	N3	212.9	-0.61	542.5	-0.37
7.5	N2	184.3	-0.66	159.6	-0.82
	N3	212.9	-0.61	381.0	-0.56

^aTreatment in DMES medium for 1 day at 37°C.

^bIV= (MT–MC)/MC, where MT corresponds to the median of the fluorescence for treated parasites and MC to that of control parasites.

Legend to Figures

Fig. 1. Chemical structures: (a) β -lapachone; (b) N2; (c) N3.

Fig. 2. Effect of the naphthoimidazoles N2 (a) and N3 (b) on epimastigote proliferation.

Fig. 3. Effect of the naphthoimidazoles N2 (a) and N3 (b) on the infection of peritoneal macrophages by *T. cruzi*.

Fig. 4. Effect of the naphthoimidazoles N1 (a), N2 (b) and N3 (c) on the epimastigote to trypomastigote differentiation process. The percent of trypomastigotes is shown.

Fig. 5. Analysis by SEM (a-c) or TEM (d-h) of *T. cruzi* epimastigotes treated for 1 day with N2 or N3. (a) Untreated epimastigote presenting the normal elongated morphology. (b,c) Parasites treated with 30 μ M N2 (b) or 30 μ M N3 (c) presenting body retraction. (d) Control epimastigote showing nucleus (N), reservosomes (R), mitochondrion (M), kinetoplast (K) and lipid bodies (L) with typical morphology. (e) Parasite treated with 20 μ M N2 showing well-developed endoplasmic reticulum (ER) profiles surrounding reservosomes (R) or mitochondrion (white arrow in inset). (f) Treatment with 25 μ M N2 resulted in altered reservosomes (star) and swelled mitochondrion (asterisk in inset). (g) Epimastigotes treated with 20 μ M N3 showing mitochondrial swelling (asterisk) and severe Golgi complex disruption (black arrowhead). Inset: endoplasmic reticulum profiles (black arrow) surrounding cytoplasmic membranar structures. (h) Epimastigotes treated with 20 μ M N3 showing disorganization in the reservosome morphology (star) and abnormal chromatin condensation (white arrowhead). In detail: altered Trans Golgi Network cisternae (black arrowhead). Bar = 1 μ m.

Fig. 6. Analysis by SEM (a-c) or TEM (d-i) of *T. cruzi* trypomastigotes treated for 1 day with N2 or N3. (a) Untreated trypomastigote showing a typical morphology. (b,c) Parasites treated with 10 μ M N2 (b) or 10 μ M N3 (c) presenting body torsion (white arrowhead). (d) Control parasites with typical kinetoplast (K), mitochondrion (M) and nucleus (N). (e-i) Trypomastigotes treated with 20 μ M N2 (e-g) or 10 μ M N3 (h,i) showing mitochondrion swelling (asterisk) and kDNA alterations (star). Treatment with the compounds also induced abnormal chromatin condensation (arrows) and membrane blebs formation (black arrowhead). Inset in i: Concentric membranar structures (white arrow) were also observed inside the mitochondrion. Bar = 1 μ m.

Fig. 7. Flow cytometry analysis of *T. cruzi* treated with N2 (a,c,e,g) or N3 (b,d,f,h). Epimastigotes labelled with Rh123 (a,b) or AO (c,d), and trypomastigotes labelled with Rh123 (e,f) or AO (g,h). Grey populations correspond to untreated parasites. Different doses of the naphthoimidazoles are indicated by arrows.

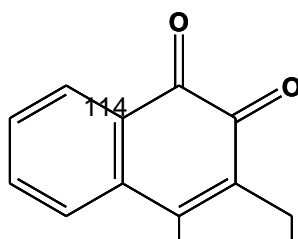


Figure 1

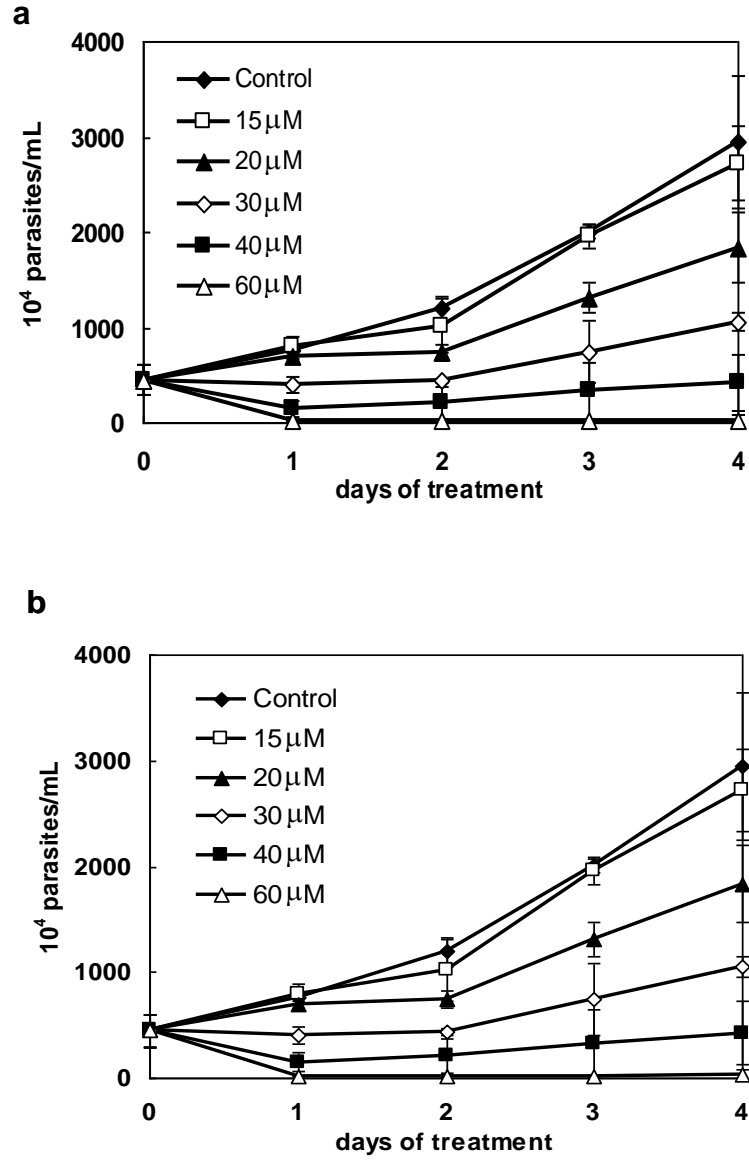


Figure 2

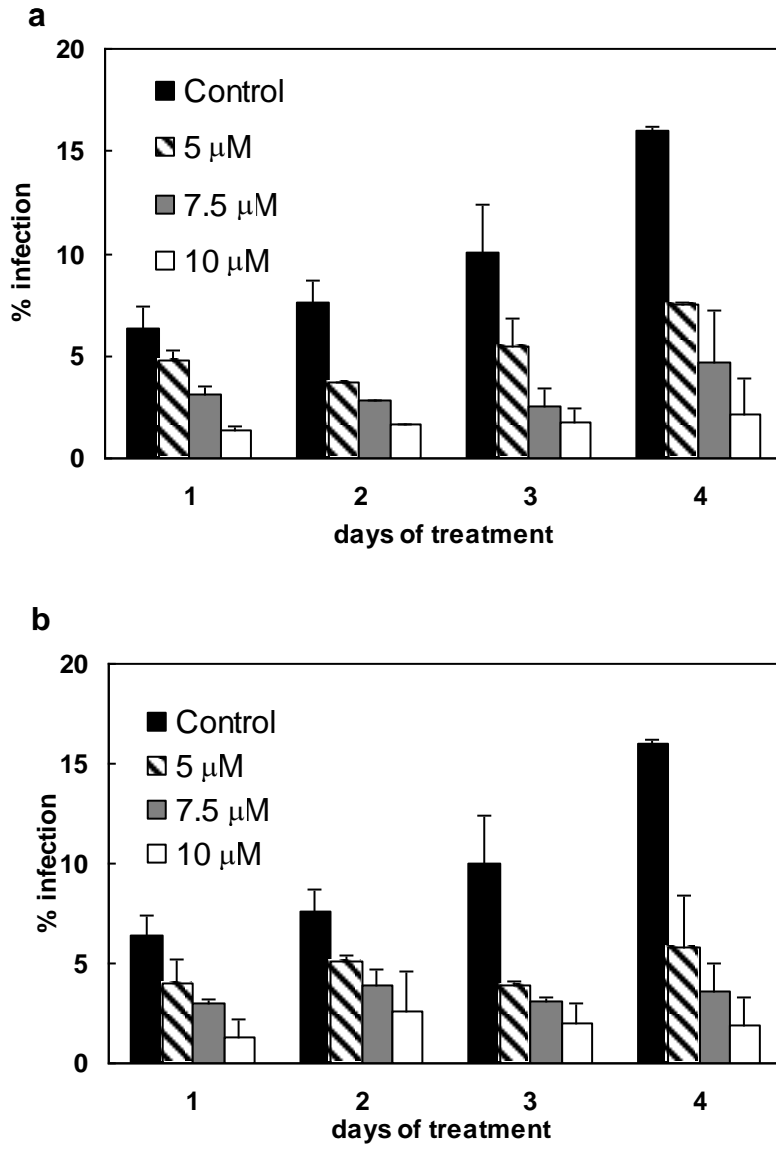


Figure 3

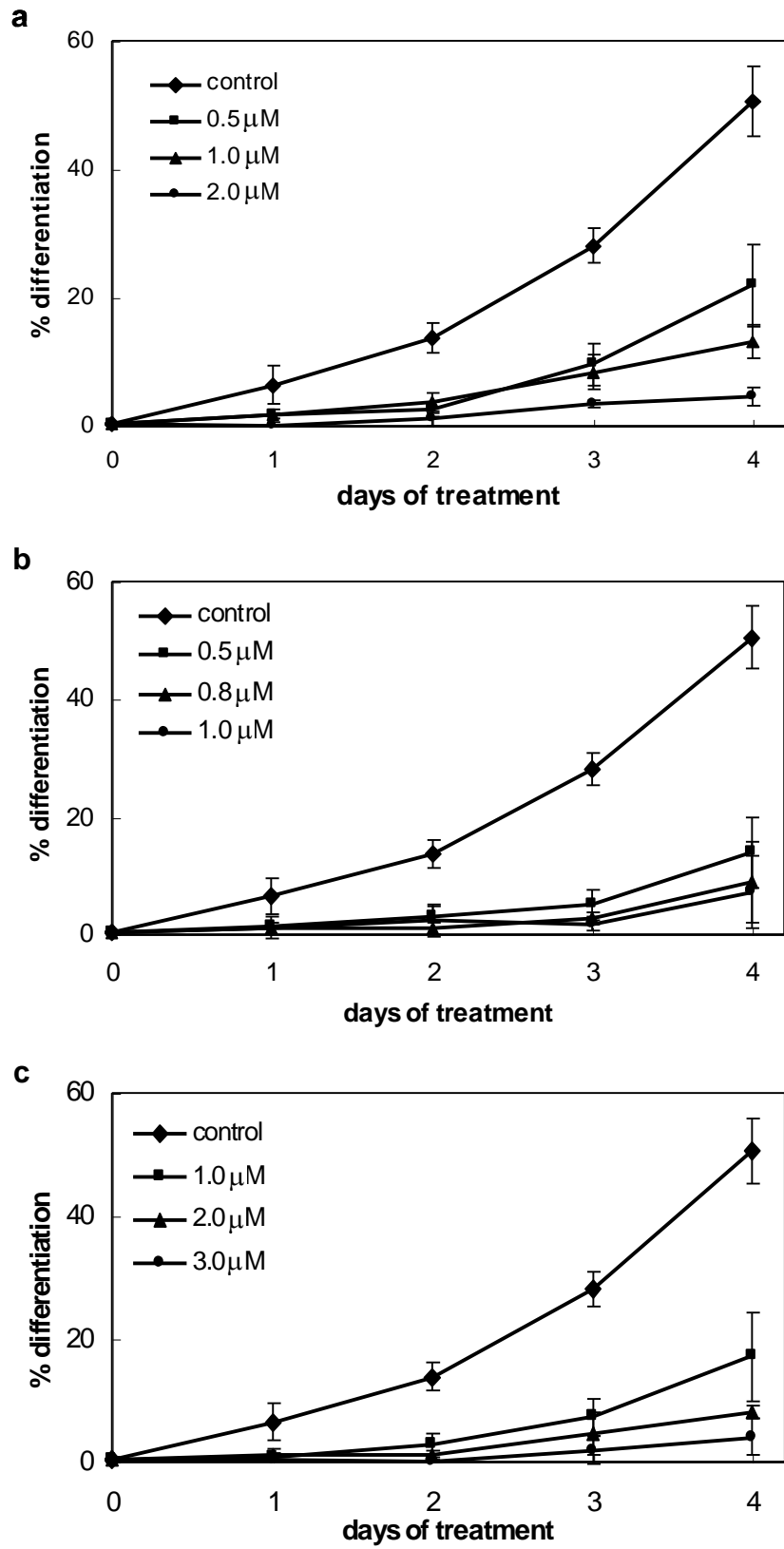


Figure 4

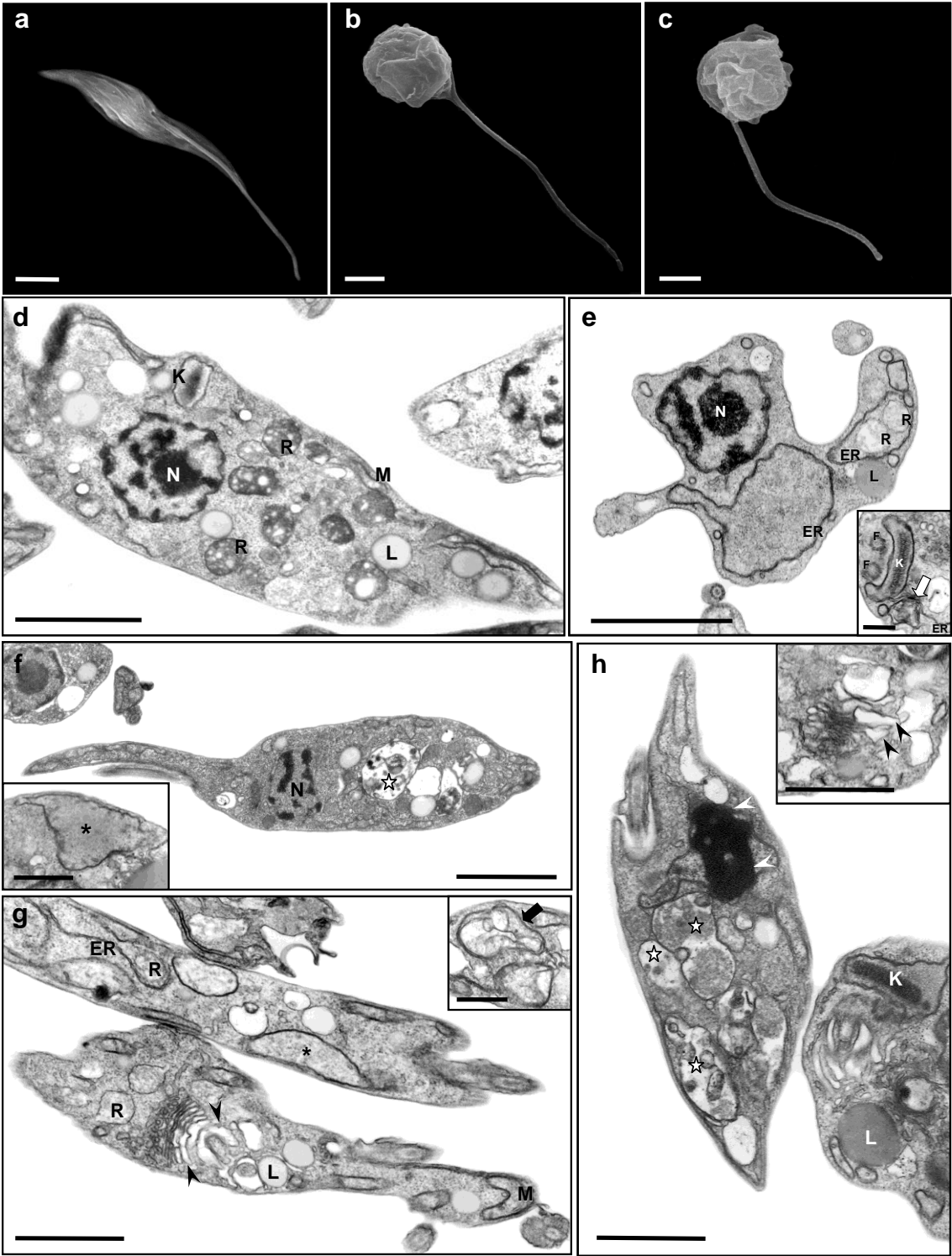


Figure 5

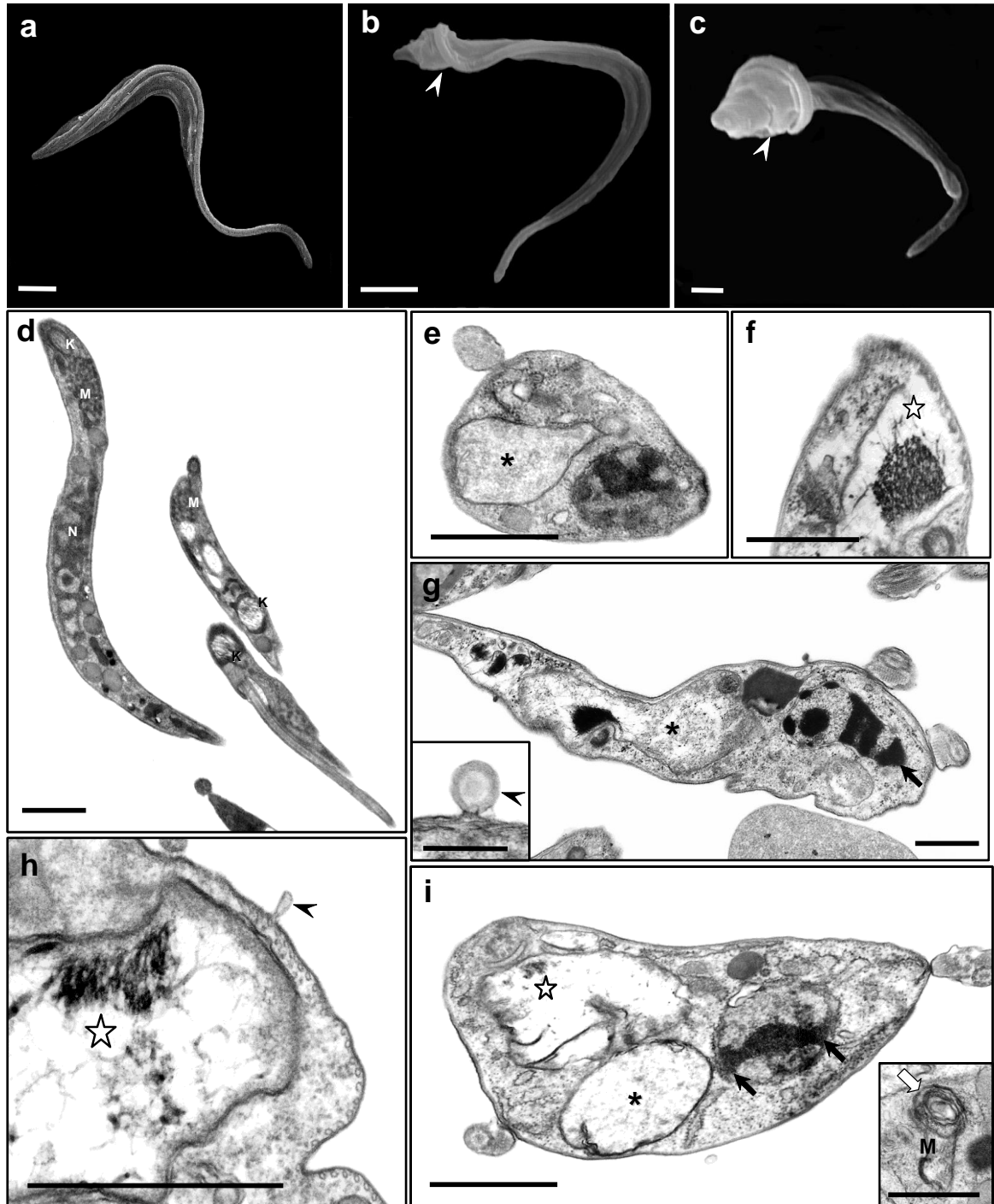


Figure 6

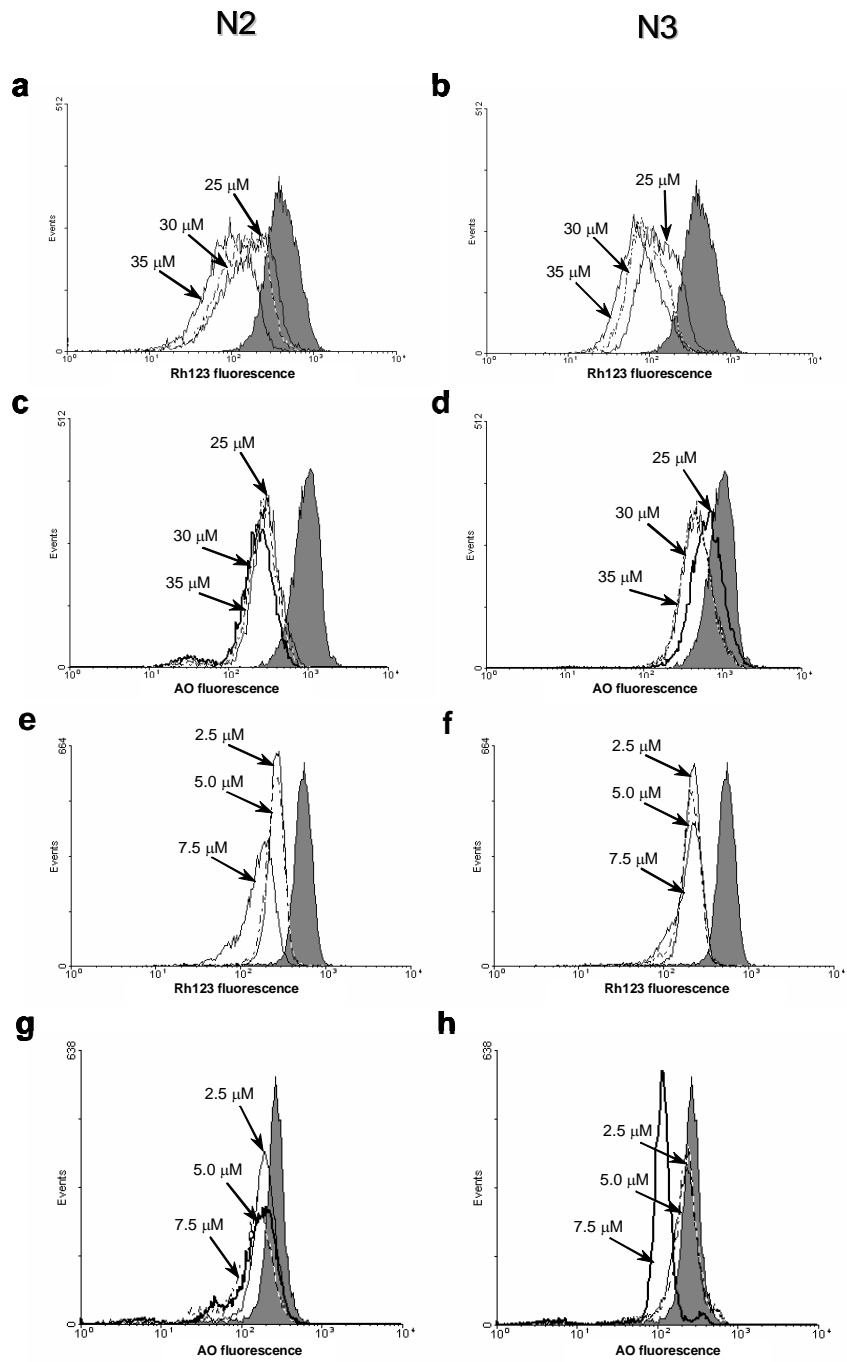


Figure 7

5. DISCUSSÃO GERAL

Estudos anteriores sobre a atividade de derivados heterocíclicos de naftoquinonas sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* apontaram dois naftoimidazóis derivados de β -lapachona como sendo os mais ativos: **N1** e **N2** (Pinto et al., 1997a; Neves-Pinto et al., 2000; revisto em Moura et al., 2001). Mais recentemente, Moura e colaboradores (2004) sintetizaram uma série de pirano[*b*-4,3]nafto[1,2-*d*]imidazóis a partir da reação da β -lapachona com aldeídos fenílicos e heterocíclicos aromáticos. Desta série, 75% dos naftoimidazóis, dentre eles o derivado **N3**, foram mais ativos que o composto padrão cristal violeta. Como a síntese foi direcionada com o objetivo de se buscar uma correlação entre atividade tripanocida e estrutura química, verificou-se que o derivado **N3** (com o grupo metila na posição *para* no anel fenila) mostrou maior atividade que o imidazol não substituído **N1** (Moura et al., 2004).

Assim, demonstrou-se que ciclofuncionalizações da β -lapachona à estrutura imidazólica produziram dois dos mais ativos derivados com grupamentos aromáticos ligados ao anel imidazólico: **N2** com grupo 3-indolila ($IC_{50}/1 d = 15,4 \pm 0,2 \mu M$) (Neves-Pinto et al., 2000) e **N3** com grupo *p*-metil fenila ($IC_{50}/1 d = 15,5 \pm 2,9 \mu M$) (Moura et al., 2004). Estes derivados foram ainda mais ativos que o naftoimidazol com grupo fenila não substituído, **N1** ($IC_{50}/1 d = 37,0 \pm 0,7 \mu M$) (Pinto et al., 1997a).

A triagem destes compostos foi realizada a 4°C, utilizando-se formas tripomastigotas sangüíneas na presença de 5% de sangue de camundongo. Após a seleção de **N1**, **N2** e **N3** para estudos subseqüentes sobre a atividade tripanocida, ensaios com formas tripomastigotas foram também realizados na ausência e na presença de 100% de sangue, à temperatura de 37°C. O aumento da quantidade de sangue de 5% para 100%, levou a uma redução na atividade tripanocida de 1,7x, 5,0x e 2,4x para os naftoimidazóis **N1**, **N2** e **N3** respectivamente, apesar do aumento da temperatura. Os fatores envolvidos nesta inativação ainda não são conhecidos. É possível que a enzima sangüínea DT-diaforase converta os naftoimidazóis em compostos não tóxicos, como descrito

para naftoquinonas (Lopes et al., 1978; Munday, 2000). Outra possibilidade envolve a interação dos derivados com proteínas séricas, ocorrendo redução do teor de composto livre devido à ligação covalente entre a carbonila quinoidal e radicais NH_2 livres das proteínas, como já demonstrado no caso de aminas primárias (Chaves et al., 1990; Pinto et al., 1997a). Entretanto, outros mecanismos de inativação não podem ser descartados, requerendo investigações subseqüentes.

Nossos dados demonstraram que os três naftoimidazóis foram ativos sobre formas epimastigotas, tripomastigotas sangüíneas e amastigotas obtidas de cultura de células. O tratamento de epimastigotas com os três compostos por até 4 dias resultou em efeito inibitório sobre a proliferação dos parasitas, sendo **N3** o composto mais ativo ($\text{IC}_{50}/1 \text{ d} = 30,7 \pm 3,6 \mu\text{M}$), seguido por **N2** ($\text{IC}_{50}/1 \text{ d} = 36,0 \pm 1,9 \mu\text{M}$) e por **N1** ($\text{IC}_{50}/1 \text{ d} = 82,8 \pm 7,4 \mu\text{M}$). Em ensaios realizados com tripomastigotas na ausência de sangue, os valores de $\text{IC}_{50}/1 \text{ d}$ para os três compostos se situaram na faixa de 12 a 37 μM , sendo um aumento para cerca de 65 μM observado na presença de 100% de sangue. Já em experimentos com amastigotas extracelulares, os valores de $\text{IC}_{50}/1 \text{ d}$ variaram entre 9 e 14 μM . Uma comparação da atividade dos três naftoimidazóis sobre as três formas evolutivas do parasita demonstrou a seguinte ordem de atividade: amastigotas > tripomastigotas > epimastigotas, indicando assim que as formas de *T. cruzi* presentes no hospedeiro vertebrado (amastigotas e tripomastigotas) são mais susceptíveis que as formas presentes no inseto vetor (epimastigotas).

O efeito dos três naftoimidazóis sobre formas amastigotas intracelulares foi investigado em macrófagos peritoneais de camundongos e também, no caso de **N1**, em células musculares cardíacas. O tratamento por 4 dias de macrófagos peritoneais com os três naftoimidazóis inibiu a percentagem de infecção em até 91,2% (**N1**), 93,9% (**N2**) e 94,1% (**N3**). A inibição deste mesmo parâmetro também foi observada em cardiomiócitos tratados com **N1**, oscilando na faixa de 31% a 47% (1-4 dias de tratamento). O acompanhamento por microscopia de luz mostrou que os naftoimidazóis causam danos em macrófagos apenas em concentrações acima de 100 μM (**N2** e **N3**) ou 200 μM (**N1**). Para células cardíacas, os três naftoimidazóis foram tóxicos em concentrações acima de 100 μM . A susceptibilidade de amastigotas intracelulares aos três naftoimidazóis foi 25x (**N1**), 17x (**N2**) e 14x (**N3**) maior que a de macrófagos.

No laboratório da Dra. Marta Dubin (Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Buenos Aires, Argentina) vem sendo investigados os possíveis efeitos tóxicos de **N1**, **N2** e **N3** no hospedeiro vertebrado, utilizando-se células de fígado de rato como modelo experimental. Em frações microsomais tratadas com 25 a 50 μM dos compostos não foram observadas modificações nas atividades das enzimas aminopirina demetilase e 7-etoxicumarina deetilase (catalisadas por citocromo P-450) e no consumo de oxigênio na presença de ascorbato (reação catalisada por NADPH-citocromo-P450). Nas frações microsomais houve uma inibição significativa da lipoperoxidação após incubação por 1 hora com os compostos na faixa de 0,05 a 10 μM . Em estudos com mitocôndrias isoladas e tratadas com os naftoimidazóis (25 μM) observou-se desacoplamento da fosforilação oxidativa, sendo este o único efeito tóxico encontrado (Celentano et al., 2005; Casanova et al., 2005). Nossos resultados obtidos em ensaios com macrófagos e células musculares infectadas, bem como os ensaios bioquímicos com frações microsomais e mitocondriais de fígado de rato, nos motivam a elaborar no futuro experimentos *in vivo* com camundongos infectados.

No **Artigo 1** foram apresentados os resultados da análise ultra-estrutural de *T. cruzi* após

tratamento por 1 dia com **N1**, e no **Artigo 2** os resultados para **N2** e **N3**.

Epimastigotas tratados com **N1** (20 e 40 μM) apresentaram em exame por microscopia eletrônica de transmissão (MET) inchaço da mitocôndria, desorganização de reservosomos e distribuição anormal da cromatina nuclear (tratamento com **N1**), enquanto por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi observada alteração na morfologia, com retração do corpo. Tripomastigotas tratados (25 e 40 μM **N1**) apresentaram por exame ao MET desorganização do kDNA, inchaço da mitocôndria, redução da elétrondensidade de acidocalcisomos e condensação anormal de cromatina, enquanto a observação por MEV demonstrou danos semelhantes aos observados em epimastigotas, além de um desprendimento do flagelo.

O tratamento de epimastigotas com 20 μM de **N2** ou **N3** induziu a formação de perfis de retículo endoplasmático bem desenvolvidos ao redor de organelas citoplasmáticas, uma severa ruptura do complexo de Golgi, além de alterações em reservosomos e na mitocôndria, como observado em parasitas tratados com **N1**. Tripomastigotas tratados (10 a 30 μM) apresentaram aumento do volume da mitocôndria com formação de estruturas membranares no interior da organela, alterações no kDNA, condensação anormal de cromatina, formação de “blebs” na membrana plasmática e torsão da região posterior do corpo. Resultados semelhantes foram obtidos após tratamento de formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas com 40 μM de β -lapachona por 3 h (Docampo et al., 1977, 1978b). Nesses estudos, análises por MET demonstraram distribuição anormal da cromatina, alterações em membranas nucleares, mitocondriais e citoplasmáticas, além de inchaço da mitocôndria, embora a integridade do cinetoplasto tenha sido mantida (Docampo et al., 1977, 1978b).

Visando uma melhor caracterização do efeito dos três naftoimidazóis sobre a mitocôndria de *T. cruzi*, a técnica de citometria de fluxo foi empregada para avaliar a susceptibilidade desta organela em subpopulações de parasitas tratados. O potencial desta ferramenta para detectar organelas e/ou alvos bioquímicos específicos de drogas foi avaliado em promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com pentamidina, alopurinol e anfotericina B, tendo sido demonstrado ser esta técnica bastante eficaz (Azas et al., 1997). Para tanto, foi utilizado um marcador celular vital, a rodamina 123 (R-123). Em epimastigotas e tripomastigotas tratados, a redução da fluorescência de R-123 confirmou o inchaço mitocondrial observado por MET, sugerindo que o tratamento interfira com o potencial eletroquímico da membrana mitocondrial. Esta diminuição foi quantificada através de um índice de variação da marcação, que oscilou entre -0,44 e -0,76 em epimastigotas e entre -0,51 e -0,66 em tripomastigotas tratados. Este efeito na mitocôndria não foi decorrente de uma permeabilização de membrana plasmática, uma vez que epimastigotas tratados com até 35 μM dos três naftoimidazóis (valores \leq $\text{IC}_{50}/1$ d) e tripomastigotas tratados com até 15 μM (valores $<$ $\text{IC}_{50}/1$ d, na ausência de sangue) e concomitantemente marcados com R-123 e iodeto de propídio (PI) apresentaram apenas a uma pequena percentagem de células PI-positivas, semelhante ao observado no controle. Esses resultados, juntamente com os danos ultra-estruturais à rede de kDNA em tripomastigotas (na faixa de 10-40 μM dos três naftoimidazóis), mostram que a mitocôndria de tripomastigotas é mais susceptível ao tratamento do que a mitocôndria de epimastigotas.

Sobre a mitocôndria, alterações semelhantes foram relatadas por Maarouf e colaboradores (1997) demonstrando que promastigotas de *Leishmania donovani*

tratadas com paromomicina (150-200 $\mu\text{M}/3$ d) apresentavam um decréscimo na diferença de potencial elétrico intermembranar mitocondrial, além da perda de atividade de desidrogenase mitocondrial e redução do consumo de oxigênio, sugerindo que esta disfunção respiratória levaria à inibição da proliferação dos parasitas. Epimastigotas de *T. cruzi* tratados com β -lapachona (4 $\mu\text{M}/1$ d) apresentaram uma redução nas taxas de respiração (Docampo et al., 1977). É possível que comprometimento respiratório semelhante possa estar ocorrendo no tratamento do parasita com **N1**, **N2** e **N3**. Visando confirmar esta hipótese, foi avaliada a atividade da succinato citocromo c redutase, enzima envolvida na cadeia respiratória. Epimastigotas tratados por 1 dia mostraram uma inibição da atividade enzimática, sendo as percentagens de inibição em relação ao controle $17,2 \pm 4,1\%$, $16,6 \pm 0,8\%$ e $42,3 \pm 4,3\%$, para, respectivamente, 50 μM **N1**, 30 μM **N2** e 30 μM **N3**. Esses dados demonstram um comprometimento do metabolismo energético de parasitas tratados com concentrações sempre abaixo do valor do $\text{IC}_{50}/1$ d, reforçando a hipótese de ser a mitocôndria um alvo inicial destes compostos. Estudos anteriores com promastigotas de *Herpetomonas samuelpeessoai* tratados com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavaca) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}/3$ d) também mostraram um decréscimo na atividade desta enzima (Holetz et al., 2003). Ensaio com *Leishmania major* e *L. donovani* tratadas com licochalcona (10 $\mu\text{g}/\text{mL}/1$ d) demonstraram uma diminuição na atividade de pelo menos 5 enzimas da cadeia respiratória: fumarato redutase, succinato e NADH desidrogenases, succinato e NADH citocromo c redutases (Zhai et al., 1995). Estes resultados sugerem a mitocôndria de tripanosomatídeos é o alvo potencial para agentes fitoterápicos.

O tratamento com os três naftoimidazóis induziu alterações no DNA nuclear e de cinetoplasto (kDNA) em formas tripomastigotas. Entretanto, epimastigotas tratados mantiveram a morfologia normal do cinetoplasto e cromatina nuclear, com exceção de parasitas tratados com **N1**, onde uma condensação da cromatina foi observada. Estudos prévios com *T. cruzi* tratados com 288 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ofloxacina (inibidor de topoisomerase II bacteriana) por 1 dia demonstraram dano no cinetoplasto e no núcleo, sendo sugerido o DNA como alvo deste inibidor (Gonzales-Perdomo et al., 1990). Mais recentemente, demonstrou-se que os inibidores de topoisomerase II ácido nalidíxico, novobiocina e etoposídeo, na faixa de 150-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 1 dia, promoveram alterações morfológicas no DNA de cinetoplasto de vários tripanosomatídeos como, *T. cruzi*, *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia fasciculata* e *Leishmania amazonensis* (Cavalcanti et al., 2004). A camptotecina (inibidor de DNA topoisomerase I de eucariotos) na faixa de 1-3 μM induziu a quebra de DNA nuclear e mitocondrial em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. donovani* (Bodley & Shapiro, 1995). Vem sendo amplamente demonstrado o efeito de β -lapachona sobre topoisomerasas I e II de mamíferos (Li et al., 1993b; Verma, 2005; revisto em Bailly, 2000). Nossos resultados morfológicos por MET de tripomastigotas, sugerem que o modo de ação

dos naftoimidazóis **N1**, **N2** e **N3**, possa envolver através da interferência direta e/ou de metabólitos com alguma enzima chave na regulação gênica dos tripanosomatídeos. Entretanto, serão necessários estudos bioquímicos e moleculares detalhados para caracterização desses mecanismos.

Para aprofundar o estudo do efeito dos naftoimidazóis sobre reservosomos, uma vez que por MET foram observadas alterações nestas organelas, parasitas tratados foram marcados com laranja de acridina (LA) e analisados por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. O tratamento de epimastigotas com **N1**, **N2** ou **N3** induziu um decréscimo na fluorescência da LA, marcador amplamente utilizado para identificar compartimentos ácidos, como reservosomos em epimastigotas (Soares, 1999; Porto-Carreiro et al., 2000). Este decréscimo foi observado através do índice de variação (valores entre -0,19 e -0,65 em parasitas tratados), sugerindo que os reservosomos sejam alvo desses naftoimidazóis, interferindo com a via endocítica do parasita, uma vez que a principal função dessas organelas é o acúmulo de macromoléculas endocitadas. Desta forma, os dados por citometria de fluxo confirmam os resultados obtidos por microscopia eletrônica.

Em células eucarióticas, a via endocítica consiste em um mecanismo para obtenção de nutrientes necessários a processos metabólicos como diferenciação e divisão celular. Nos tripanosomatídeos, a obtenção de nutrientes depende do hospedeiro, sendo que a captação de moléculas como LDL, albumina e transferrina garante o suprimento de ferro e esteróis do protozoário (Webster & Grab, 1988; Coppens et al., 1995). Em *T. cruzi*, apenas formas epimastigotas apresentam este processo ativo, sendo o reservosomo um compartimento pré-lisosomal onde proteínas e lipídeos são acumulados (Soares & De Souza, 1988; revisto em Soares, 1999). Segundo Figueiredo e colaboradores (2004), estas organelas sofrem um processo de maturação tornando-se capazes de receber moléculas através da fusão com vesículas endocíticas provenientes diretamente da bolsa flagelar e do citóstoma, sítios conhecidos de endocitose deste parasita (Soares & De Souza, 1991; Soares, 1999). Porto-Carreiro e colaboradores (2000) acreditam na existência de uma estrutura tubular pertencente à via endocítica correspondente ao endossomo inicial em mamíferos, que então se fundiria aos reservosomos. Experimentos com transferrina acoplada a partículas de ouro coloidal (Tf-Au) foram realizados para investigar se a via endocítica seria alvo dos três naftoimidazóis. A incubação de epimastigotas tratados com os compostos e em seguida incubados com Tf-Au por tempos curtos (10 min) mostrou que vesículas endocíticas não são afetadas pelos derivados, ocorrendo o mesmo padrão de localização em eventos iniciais da via endocítica que nos parasitas controle. Como foram observadas alterações morfológicas em reservosomos por análise ultra-estrutural, é possível que estes naftoimidazóis interfiram apenas em eventos finais relacionados a via endocítica, no nível dos reservosomos.

No processo de metaciclogênese, o reservosomo é considerado como a principal fonte energética, uma vez que seu conteúdo é consumido, levando ao desaparecimento da organela em tripomastigotas (Soares et al., 1989; Figueiredo et al., 2000; De Souza et al., 2000). Após 4 dias, a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas em meio TAU3AAG foi inibida pelos três compostos, apresentando os seguintes valores de $IC_{50}/4\text{ d}$: $0,35 \pm 0,01\ \mu\text{M}$ (**N1**), $0,48 \pm 0,06\ \mu\text{M}$ (**N2**) e $0,66 \pm 0,08\ \mu\text{M}$ (**N3**). Uma vez que os três naftoimidazóis bloquearam a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas em concentrações que não afetam a viabilidade do parasita, é possível que a inibição deste processo tenha relação direta com o dano observado em reservosomos.

Em tripomastigotas, a marcação de LA ocorre predominantemente em acidocalcisomos (Docampo & Moreno, 2001; Docampo et al., 2005), sendo que estas formas não apresentam reservosomos (Soares & De Souza, 1991). Foi detectada uma redução da intensidade de fluorescência de LA em formas tripomastigotas sanguíneas tratadas com os naftoimidazóis, com o índice de variação entre -0,13 e -0,82. Como este tratamento afeta a mitocôndria, conseqüentemente, ocorre comprometimento do metabolismo energético do parasita. Nos acidocalcisomos são encontradas altas concentrações de polifosfato e pirofosfato, podendo a hidrólise destes representar uma fonte de energia secundária para tripomastigotas (Docampo & Moreno., 2001; Docampo et al., 2005), o que resultaria na diminuição da elétrondensidade de acidocalcisomos observada no tratamento com **N1** por MET. Para **N2** e **N3**, o padrão de elétrondensidade dos acidocalcisomos foi morfológicamente semelhante ao de organelas de parasitas controle. Uma vez que a detecção de acidocalcisomos varia dependendo do processamento para microscopia eletrônica (Docampo et al., 2005), estudos bioquímicos futuros devem ser feitos para confirmar se acidocalcisomos são alvos de naftoimidazóis.

No *T. cruzi*, o complexo de Golgi é composto por um grupo de 4-8 cisternas e está localizado anterior ao núcleo e cinetoplasto, próximo à bolsa flagelar, facilitando a secreção de glicoproteínas para o meio extracelular, como é o caso de fosfatases ácidas de algumas espécies do gênero *Leishmania* (Dwyer & Gottlieb, 1983; Figueiredo & Soares, 1995). Embora a maquinaria envolvida na formação, endereçamento e fusão das vesículas de transporte no retículo endoplasmático e complexo de Golgi esteja melhor compreendida em células de mamíferos, diferenças significantes na função desta organela e no mecanismo de tráfego de proteínas são observadas entre células eucarióticas primitivas e superiores (Rothman & Wieland, 1996). Estes relatos sugerem que esta organela pode ser um interessante alvo de quimioterápicos. O tratamento de epimastigotas com os naftoimidazóis **N2** e **N3** resultou em um aumento do número e tamanho das cisternas do complexo de Golgi, essencialmente na região da "Trans Golgi Network". Alterações semelhantes foram observadas em epimastigotas tratados com inibidores de cisteína proteinase (Engel et al., 1998), sugerindo os autores que a inibição acumulativa da síntese *de novo* de cruzipaina estaria interrompendo o tráfego normal de proteínas, acarretando em dano subsequente ao complexo de Golgi e ao retículo endoplasmático. Uma hipótese plausível seria que os derivados de β -lapachona e/ou algum metabólito estariam bloqueando a síntese de proteínas no nível do complexo de Golgi, o que resultaria no alargamento destas cisternas. Estudos prévios com epimastigotas mostraram uma inibição da síntese protéica em parasitas tratados com β -lapachona (Goijman et al., 1984).

Tripomastigotas tratados com **N2** e **N3** apresentaram a formação de "blebs" na membrana plasmática. Apesar deste efeito em membranas, não foram observadas alterações em microtúbulos subpeliculares, que apresentaram sua organização peculiar. Estas estruturas são reconhecidamente

resistentes à ação de quimioterápicos, fato comumente observado em estudos ultra-estruturais do efeito de diferentes classes de compostos sobre *T. cruzi* (Baum et al., 1981; Franke de Cazzulo et al., 1998; Dantas et al., 2003), representando inclusive uma das maiores dificuldades em técnicas de subfracionamento de tripanosomatídeos (Pereira et al., 1978; De Castro et al., 1979). Nossos resultados de MET sugerem que o tratamento com os naftoimidazóis esteja promovendo um desprendimento (“shedding”) de porções da membrana plasmática do parasita.

Naftoquinonas como a β -lapachona podem gerar radicais livres (Boveris et al., 1978; Molina Portela et al., 1996). Entretanto as estruturas dos derivados **N1**, **N2** e **N3** não conferem esta capacidade, podendo a hipótese de estresse oxidativo ser descartada, uma vez que estes compostos não sofrem facilmente reações redox. Estes dados foram confirmados pelo tratamento com os naftoimidazóis e utilizando frações microsomais de fígado de rato, nas quais não foi observada modificação no consumo de oxigênio na presença de ascorbato, uma reação da enzima citocromo c redutase catalisada por NADPH-citocromo-P450 (Celentano et al., 2005; Casanova et al., 2005). É possível que a alta atividade destes naftoimidazóis sobre *T. cruzi*, quando comparados com outras classes de derivados de β -lapachona, possa estar relacionada à estrutura básica imidazol, presente na molécula de benznidazol e em várias outras substâncias com atividade tripanocida (Navarro et al., 2001; Buckner et al., 2003; Aguirre et al., 2004).

Nos **Artigos 1** e **2** demonstramos que a mitocôndria, compartimentos acídicos (especialmente reservosomos em epimastigotas) e complexo de Golgi são susceptíveis ao tratamento com os naftoimidazóis **N1**, **N2** e **N3**. Alterações no padrão de cromatina e na rede de kDNA também foram observados. Resultados preliminares mostrando a fragmentação de DNA em tripomastigotas tratados bem como a estrutura planar desses derivados nos estimula a estudar melhor o mecanismo de interação entre naftoimidazóis e o DNA de *T. cruzi*, investigando o mecanismo genotóxico dos compostos na morte *in vitro* do parasita.

Nossos resultados obtidos com **N1**, **N2** e **N3** incentivam a investigação dos seus efeitos em modelo *in vivo*. A continuidade dos estudos com naftoimidazóis na área de quimioterapia de doença de Chagas poderá gerar novos compostos ou combinações destes que venham a substituir os nitroderivados, sobre os quais pesam sérias restrições, tanto quanto à eficácia variável como quanto à alta toxicidade.

6. CONCLUSÕES

1. A comparação da atividade *in vitro* dos três naftoimidazóis (**N1**, **N2** e **N3**) sobre as três formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* demonstrou a seguinte ordem de susceptibilidade: amastigotas > tripomastigotas > epimastigotas, indicando assim que as formas do parasita presentes no hospedeiro vertebrado são mais susceptíveis que as formas presentes no inseto vetor. Os compostos também bloquearam o processo de metaciclogênese;
2. Os compostos apresentaram baixa toxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*, sendo tóxicos apenas em concentrações cerca de 25x (**N1**), 17x (**N2**) e 14x (**N3**) maiores que as eficazes para interferir na proliferação intracelular de *T. cruzi*;
3. Epimastigotas tratados com os naftoimidazóis apresentaram alterações ultra-estruturais na mitocôndria, reservosomos, complexo de Golgi e cromatina nuclear (apenas em parasitas tratados com **N1**). Já em tripomastigotas, foram observados danos progressivos no kDNA e na mitocôndria, formação de “blebs” na membrana plasmática, além de condensação anormal da cromatina nuclear;
4. A mitocôndria de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* é o alvo inicial da ação de **N1**, **N2** e **N3**, como demonstrado pela: (a) diminuição da fluorescência de R-123 avaliada por citometria de fluxo; (b) alteração ultra-estrutural; (c) inibição da enzima succinato citocromo c redutase de epimastigotas;
5. Alterações morfológicas juntamente com a redução da fluorescência de LA observada por citometria de fluxo, indicam o reservosomo como outro alvo dos naftomidazóis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre G, Cabrera E, Cerecetto H, Di Maio R, Gonzalez M, Seoane G, et al. Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational design. Eur J Med Chem 2004;39: 421-431.
- Alves TM, Alves R, Romanha AJ, Zani CL, dos Santos MH, Nagem TJ. Biological activities of 7-epiclusianone. J Nat Prod 1999;62:369-371.
- Andrade ZA. A patologia da doença de Chagas no homem. Ann Soc Belge Med Trop 1985;65(suppl 1):15-30.
- Andrade-Neto VF, Goulart MO, Silva Filho JF, da Silva MJ, Pinto MC, Pinto AV, et al. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. Bioorg Med Chem Lett 2004;14:1145-1149.
- Andrews N. Yale Medical School. Cell Biology – Yale [online] Yale, USA, 2005. [capturado em 26 de julho de 2005]. Disponível em: http://www.cellbiology.yale.edu/cellbio/images/faculty/n_andrews/n_andrews_fig01.jpg
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota de informação da Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de Santa Catarina [online]. Santa Catarina, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>
- Apt W, Aguilera X, Arribada A, Perez C, Miranda C, Sanchez G, et al. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. Am J Trop Med Hyg 1998;59:133-138.
- Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas SL, Rodriguez J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. Ann Trop Med Parasitol 2003;97:23-29.
- Arenas P. Medicine and magic among the Maka Indians of the Paraguayan Chaco. J Ethnopharmacol 1987;21:279-295.
- Arruda DC, D'Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SR. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1679-1687.
- Atclas J, Sinagra A, Jaimovich G, Salgueira C, Luna C, Requejo A, et al. Reactivation of chronic Chagas' disease following allogeneic bone marrow transplantation and successful pre-emptive therapy with benznidazole. Transpl Infect Dis 1999;1:135-137.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Nat Acad Sci USA 2004;101:2034-2039.
- [Augustyns K, Amssoms K, Yamani A, Rajan PK, Haemers A](#). Trypanothione as a target in the design

- of antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Curr Pharm Des* 2001;12:1117-1141.
- Azas N, Di Giorgio C, Delmas F, Gasquet M, Timon-David P. *Leishmania infantum* promastigotes: flow cytometry as a possible tool for assessing the effects of drugs on cellular functions. *Exp Parasitol* 1997;87:1-7.
- Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 2000;7:39-58.
- Barbosa HS. Fundação Oswaldo Cruz. Agência Fiocruz de Notícias [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/estetica/chagas.htm>
- Bastien JW. Pharmacopeia of Qollahuaya Andeans. *J Ethnopharmacol* 1983;8:97-111.
- Baum SG, Wittner M, Nadler JP, Horwitz SB, Dennis JE, Schiff PB, et al. Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4571-4575.
- Benchimol M, De Souza W, Machado RD. An electron microscopic investigation of the surface coat of the electrocyte of *Electrophorus electricus*. *Cell Tissue Res* 1977;183:239-253.
- Benchimol M, De Souza W, Vanderheyden N, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, et al. Functional expression of a vacuolar-type H⁺-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1998;332:695-702.
- Binutu OA, Adesogan KE, Okogun JI. Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Med* 1996;62:352-353.
- Bittencourt AL. American trypanosomiasis (Chagas' disease) In: MacLeod, org. *Parasitic infections in pregnancy and the newborn*. Oxford: Oxford Med Pub; 1988. p. 62-86.
- Bodley AL, Shapiro TA. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3726-3730.
- Bonnet B, Soullez D, Davioud-Charvet E, Landry V, Horvath D, Sergheraert C. New spermine and spermidine derivatives as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *Bioorg Med Chem* 1997;5:1249-1256.
- Bonse S, Richards JM, Ross SA, Lowe G, Krauth-Siegel RL. (2,2':6',2"-Terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. *J Med Chem* 2000;43:4812-4821.

- Boothman DA, Greer S, Pardee AB. Potentiation of halogenated pyrimidine radiosensitizers in human carcinoma cells by β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-*b*]pyran-5,6-dione), a novel DNA repair inhibitor. *Cancer Res* 1987;47:5361-5366.
- Boothman DA, Pardee AB. Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by β -lapachone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4963-4967.
- Borst P, Hoeijmakers JH. Kinetoplast DNA. *Plasmid* 1979;2:20-40.
- Boveris A, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AO. Effect of α - and β -lapachone on the production of H₂O₂ and on the growth of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Assoc Argent Microbiol* 1977;9:54-61.
- Boveris A, Stoppani AOM, Do Campo R, Cruz FS. Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 1978;61C:327-329.
- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1980;188:643-648.
- Brack C. Electronmicroscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop* 1968;25:289-356.
- Brener, Z. Laboratory-acquired Chagas' disease: an endemic disease among parasitologists? *In*: Morel CM, org. Genes and antigens of parasites: a laboratory manual. 2 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1984. p. 3-9.
- Brener Z, Alvarenga NJ. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector. Symposium on new approaches in American Trypanosomiasis Research. Washington: Pan Amer Health Orgn; 1976. p. 83-86.
- Brener Z, Cañado JR, Galvão LM, da Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME, et al. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;88:149-153.
- Bregio SD, Belmonte SA, Guerreiro E, Giordano OS, Pietrobon EO, Sosa MA. The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 2000;86:407-412.
- Brunmark A, Cadenas E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad Biol Med* 1989;7:435-477.
- Buckner F, Yokoyama K, Lockman J, Aikenhead K, Ohkanda J, Sadilek M, et al. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003;100:15149-15153.

- Burnett AR, Thomson RH. Naturally occurring quinones. Part X. The quinonoid constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignonaceae). J Chem Soc Sect C 1967; 32:2100-2104.
- Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodome in the intragastric experimental infection, Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002;44:97-103.
- Cançado JR. Terapêutica específica In: Dias & Coura, orgs. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 323-351.
- Carvalho LH, Rocha EM, Raslan DS, Oliveira AB, Krettli AU. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Braz J Med Biol Res 1987;21:485-487.
- Casanova MB, Celentano AM, Hollender D, Menna-Barreto RFS, Pinto AV, De Castro SL, et al. Toxicity of naphthoimidazoles derived from β -lapachone with trypanocidal activity. XXXVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental (SAFE); 2005 Nov 15-19; Mar del Plata, Argentina.
- Cavalcanti DP, Fragoso SP, Goldenberg S, de Souza W, Motta MC. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. Parasitol Res 2004;94:439-448.
- Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A valid target for chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des 2001;7:1143-1156.
- Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: Potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. Curr Top Med Chem 2002;2:1261-1271.
- Celentano AM, Casanova M, Hollender D, Menna-Barreto RFS, Pinto AV, de Castro SL, et al. Estudios de toxicidad de naftoimidazoles derivados de la β -lapachona, com actividad tripanocida. Congreso de la Sociedad Argentina de Parasitología; 2005 Oct; Mendoza, Argentina.
- Chagas C. Nova tripanosomíase humana Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* gen. nov. sp. nov., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;1:159-218.
- Chan C, Yin H, Garforth J, McKie JH, Jaouhari R, Speers P, et al. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. J Med Chem 1998;41:148-156.
- Chau YP, Shiah SG, Don MJ, Kuo ML. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. Free Radic Biol Med 1998;24:660-670.

- Chaves JP, Pinto MCFR, Pinto AV. Heterocyclics from quinones. I - Reaction of lapachol with primary alkyl amines. *J Braz Chem Soc* 1990;1:21-27.
- Choi BT, Cheong J, Choi YH. β -Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF- κ B in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs* 2003;14:845-850.
- Choi YH, Kim MJ, Lee SY, Lee YN, Chi GY, Eom HS, et al. Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during β -lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. *Int J Oncol* 2002;21:1293-1299.
- Comporti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem-Biol Interact* 1989;72:1-56.
- Consolação M, Linardi F, de Oliveira MM, Sampaio MR. A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. *J Med Chem* 1975;18:1159-1161.
- Cook MJ. Six-membered rings with more than one oxygen or sulfur atom. *In: Katritzky & Rees, eds. Comprehensive heterocyclic chemistry*. New York: Pergamon Press; 1984. v.3. p. 943-994.
- Coppens I, Levade T, Courtoy PJ. Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1995;270:5736-5741.
- Corrêa AFS, Andrade LR, Soares MJ. Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms. *Parasitol Res* 2002;88: 875-880.
- Coura JR. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. *Bol Chil Parasitol* 1996;51:69-75.
- Coura JR, De Castro. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3-24.
- Coura JR, Naranjo MA, Willcox HP. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. II. A serological survey. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995a;37:103-107.
- Coura JR, Junqueira AC, Giordano CM, Funatsu RK. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. I - A short review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1994;36: 363-368.
- Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O. Chagas disease: From bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Suppl 1):379-384.
- Coura JR, Willcox HP, Arboleda Naranjo M, Fernandes O, Paiva DD. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. III. A cross-sectional study (1). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995b;37:415-420.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 2002;18:171-176.
- Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, et al. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:159-165.

- Cruz FS, Gilbert B, Lopes JN, Pinchin R, Pinto AV. The reaction of α - and β -lapachone with N-bromosuccinimide. *Rev Latinoamer Quím* 1977;8:138-140.
- Cruz FS, Docampo R, Boveris A. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide from β -lapachone in bacteria. *Antimicrob Agents Chemoter* 1978;14:630-633.
- Cunha-e-Silva NL, Atella GC, Porto-Carreiro IA, Morgado-Diaz JA, Pereira MG, De Souza W. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:7-12.
- D'Albuquerque IL, Maciel MCN, Schuler AR, De Araújo MC, Medeiros Maciel G, Cavalcanti MSB, et al. Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). *Rev Inst Antibiot Univ Recife* 1972;12:31-40.
- Dantas AP, Barbosa HS, De Castro SL. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J Submicr Cytol Pathol* 2003;35:287-294.
- [Das A](#), [Dasgupta A](#), [Sengupta T](#), [Majumder HK](#). Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol* 2004;20:381-387.
- De Almeida ER, da Silva Filho AA, dos Santos ER, Lopes CA. Antiinflammatory action of lapachol. *J Ethnopharmacol* 1990;29:239-241.
- De Castro SL. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1993;53:83-98.
- De Castro SL, Leon LL, Pereira NM, De Souza W, Queiroz-Cruz M, Brascher MH, et al. Isolation of an enriched plasma membrane-subpellicular microtubule fraction of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1979;75:145-155.
- De Castro SL, Pinto MCFR, Pinto AV. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. 1 - Establishing a structure/activity relationship. *Microbios* 1994;78:83-90.
- De Pahn EM, Molina Portela MP, Stoppani AO. Effect of quinones and nitrofurans on *Trypanosoma mega* and *Crithidia fasciculata*. *Rev Argent Microbiol* 1988;20:107-118.
- De Souza W. Ultra-estrutura do *Trypanosoma cruzi*. *Ciência e Cultura* 1980;31:35-47.
- De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 1984;86:197-283.

- De Souza W. O parasito e sua interação com o hospedeiro. In: Brener, Andrade & Barral-Netto, orgs. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 88-126.
- De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 2002;8:269-285.
- De Souza W, Martinez-Palomo A, Gonzalez-Robbles A. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze-fracture. *J Cell Sci* 1978;33:285-299.
- De Souza W, Carreiro IP, Miranda K, Cunha-e-Silva NL. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 2000;72:421-432.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:513-515.
- Demetry C. Worcester Polytechnic Institute [online]. Massachusetts, USA; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://users.wpi.edu/~cdemetry/Images/kiss-1.gif>
- [Deterding A](#), [Dungey FA](#), [Thompson KA](#), [Steverding D](#). Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. *Acta Trop* 2005;93:311-316.
- Deuschländer N, Vollerthun R, Hungerer KD. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI-mice. *Tropenmed Parasit* 1978;29:323-329.
- Dias JCP. Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitol Today* 1987;3:336-341.
- Dias JCP. Doença de Chagas: Clínica e Terapêutica. SUCAM, Ministério da Saúde; 1990. p. 94.
- Dias JCP, Prata A, Schofield CJ. Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002a;35:669-678.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002b;97:603-612.
- Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1988;44:880-881.
- Diaz EG, Montalto DM, Castro JA. Reactions of nifurtimox with critical sulfhydryl-containing biomolecules: their potential toxicological relevance. *J Appl Toxicol* 2004;24:189-195.
- Dinnen RD, Ebisuzaki K. The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product. *Anticancer Res* 1997;17:1027-1033.
- Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem-Biol Interactions* 1990;73:1-27.
- Docampo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Design* 2001;7:1157-1164.
- Docampo R, Moreno SNJ. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proceedings* 1986;45:2471-2476.
- Docampo R, Moreno SNJ. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 2001;33:151-159.

- Docampo R, Lopes JN, Cruz FS, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β -lapachone. *Exp Parasitol* 1977;42:142-149.
- Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1995;310:1005-12.
- Docampo R, Cruz FS, Boveris A, Muniz RP, Esquivel DM. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in β -lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Arch Biochem Biophys* 1978a;186: 292-297.
- [Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN](#). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:251-261.
- Docampo R, De Souza W, Cruz FS, Roitman I, Cover B, Gutteridge WE. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd* 1978b;57:189-198.
- Dolan ME, Frydman B, Thompson CB, Diamond AM, Garbiras BJ, Safa AR, et al. Effects of 1,2-naphthoquinones on human tumor cell growth and lack of cross-resistance with other anticancer agents. *Anticancer Drugs* 1998;9:437-448.
- Don MJ, Chang YH, Chen KK, Ho LK, Chau YP. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the β -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001;59:784-794.
- Duke JA. Medicinal plants. *Science* 1985;229:1036-1038.
- Dwyer DM, Gottlieb M. The surface membrane chemistry of *Leishmania*: its possible role in parasite sequestration and survival. *J Cell Biochem* 1983;23:35-45.
- Eakin AE, Guerra A, Focia PJ, Torres-Martinez J, Craig SP. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi* as a target for structure-based inhibitor design: crystallization and inhibition studies with purine analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1686-1692.
- Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 1998;111:597-606.
- Fagundes LJM, Angluster J, Gilbert B, Roitman I. Synthesis of sterol in *Herpetomonas samuelpessoai*: Influence of growth conditions. *J Protozool* 1980;27:238-241.
- [Faundez M, Pino L, Letelier P, Ortiz C, Lopez R, Seguel C, et al](#). Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:126-130.

- Fernández-Villamil SH, Dubin M, Molina Portela MP, Perissinotti LJ, Brusa MA, Stoppani AOM. Semiquinone production by lipophilic *o*-naphthoquinones. *Redox Report* 1997;3:245-252.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop* 2000;75:79-84.
- Ferreira MS, Nishioka AS, Rocha A, Silva AM. Doença de Chagas e imunossupressão. *In: Dias & Coura, orgs. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 365-379.
- Ferreira VF, Pinto AV, Pinto MCFR, Silva MM. Selective aromatic reduction in pyranonaphthoquinone systems. *J Chem Res* 1987; Supl: 26.
- Figueiredo RC, Soares MJ. The Golgi complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1995;27:209-215.
- Figueiredo RC, Steindel M, Soares MJ. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: Occurrence during *in vitro* cultivation. *Parasitol Res* 1994;80:517-522.
- Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol* 2000;86:1213-1218.
- Figueiredo RC, Rosa DS, Gomes YM, Nakasawa M, Soares MJ. Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. *Parasitol* 2004;129:431-438.
- Fundação Oswaldo Cruz. Agência Fiocruz de Notícias [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/estetica/chagas.htm>
- Fournet A, Inchausti A, Yaluff G, Rojas De Arias A, Guinaudeau H, Bruneton J, et al. Trypanocidal bisbenzylisoquinoline alkaloids are inhibitors of trypanothione reductase. *J Enzym Inhib* 1998;13:1-9.
- Fragoso SP, Goldenberg S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. *Mol Biochem Parasitol* 1992;55:127-134.
- Fragoso SP, Mattei D, Hines JC, Ray D, Goldenberg S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol Biochem Parasitol* 1998;94:197-204.
- Franke De Cazzulo BM, Bernacchi A, Esteva MI, Ruiz AM, Castro JA, Cazzulo JJ. Trypanocidal effect of SKF525A, proadifen, on different developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires)* 1998;58:415-418.
- Freymann DM, Wenck MA, Engel JC, Feng J, Focia PJ, Eakin AE, et al. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chem Biol* 2000;7:957-968.

- Frydman B, Marton LJ, Sun JS, Neder K, Witiak DT, Liu AA, et al. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res* 1997;57:620-627.
- Gadelha FR, Moreno SNJ, de Souza W, Cruz FS, Docampo R. The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. *Mol Biochem Parasitol* 1989;34:117-126.
- Girault S, Davioud-Charvet E, Salmon L, Berecibar A, Debreu MA, Sergheraert C. Structure-activity relationships in 2-aminodiphenylsulfides against trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:1175-1180.
- Goijman SG, Stoppani AO. Effects of nifurtimox, benznidazole, and β -lapachone on the metabolism of DNA, RNA and proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Argent Microbiol* 1983;15:193-204.
- Goijman SG, Stoppani AOM. Effect of β -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:273-280.
- Goijman SG, Frasch AC, Stoppani AO. Introduction of changes in the DNA of *Trypanosoma cruzi* by trypanocidal agents. *Rev Argent Microbiol* 1984;16:75-86.
- Goldberg B, Stern A. Production of superoxide anion during the oxidation of haemoglobin by menandione. *Biochim Biophys Acta* 1976;437:628-632.
- Gonçalves Lima O, D'Albuquerque IC, Lima CG, Maia MHD. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev Inst Antibiot (Univ Recife)* 1962;4:3-17.
- Gonçalves Lima O, Coelho JS, D'Albuquerque I, Mello JF, Martins DG, Lacerda AL, et al. Antimicrobial substances from higher plants. Antimicrobial or antineoplastic activity of lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) in comparison with lapachol (2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butanyl)-1,4-naphthoquinone. *Rev Inst Antibiot (Univ Recife)* 1971;11:21-26.
- Gonzales-Perdomo M, De Castro SL, Meirelles MN, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1707-1714.
- Goulart MOF, Zani CL, Tonholo J, Freitas LR, Abreu FC, Oliveira AB, et al. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorg Med Chem* 1997;7:2043-2048.
- Guhl F, Vellejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, et al. Isolation of

Trypanosoma cruzi DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. Am J Phys Anthropol 1999;108:401-407.

Guiraud P, Steiman R, Campos-Takaki GM, Seigle-Murandi F & Simeon de Buochberg M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. Planta Med 1994;60:373-374.

Gupta D, Podar K, Tai YT, Lin B, Hideshima T, Akiyama M, et al. β -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Exp Hematol 2002;30:711-720.

Gus I, Molon ME, Bueno AP. Chagas disease: Review of 8 simultaneous cases of acute Chagas myocarditis: 25 years later. Arq Bras Cardiol 1993;60:99-101.

Gutierrez-Correa J, Fairlamb AH, Stoppani AOM. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. Free Radic Res 2001;34:363-378.

Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Rosemberg I, Pereira M, Sela M, et al. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulphide reductase, alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:5374-5378.

Hertzberg RP, Dervan PB. Cleavage of DNA with methidiumpropyl-EDTA-iron(II): Reaction conditions and product analyses. Biochemistry 1984;23:3934-3940.

Holetz FB, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Cortez DAG, Morgado-Diaz JA, Nakamura CV. Effect of essential oil of *Ocimum gratissimum* on the trypanosomatid *Herpetomonas samuelpeessoai*. Acta Protozool 2003;42:269-276.

Houghton PJ, Photiou A, Uddin S, Shah P, Browning M, Jackson SJ, et al. Activity of extracts of *Kigelia pinnata* against melanoma and renal carcinoma cell lines. Planta Med 1994;60:430-433.

Huang L, Pardee AB. β -Lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. Mol Med 1999;5:711-720.

Jansen AM, Madeira F, Carreira JC, Medina-Acosta E, Deane MP. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: A study of the correlations and kinetics of the systemic and scent gland infections in naturally and experimentally infected animals. Exp Parasitol 1997;86:37-44.

Junqueira ACV, Degraive W, Adeilton Brandão A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. Trends Parasitol 2005;21:270-272.

Kerschmann RL, Wolfson JS, McHugh GL, Dickersin GR, Hooper DC, Swartz MN. Novobiocin-induced ultrastructural changes and antagonism of DNA synthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes growing in cell-free medium. J Protozool 1989;36:14-20.

Khabnadideh S, Pez D, Musso A, Brun R, Ruiz Perez LM, Gonzalez Pacanowska D, et al. Design,

synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;13:2637-2649.

Köberle F. Patogênese dos "megas". *Rev Goiana Med* 1956;2:101-110.

Koster AS. Bioreductive activation of quinones: A mixed blessing. *Pharm Weekbl [Sci]* 1991;13:123-132.

Krauth-Siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH, Schirmer RH. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem* 1987;164:123-128.

Krauth-Siegel RL, Meiering SK, Schmidt H. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biol Chem* 2003;384:539-549.

Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, α -lapachone, and β -lapachone. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1367-1379.

Kumi-Diaka J, Saddler-Shawnette S, Aller A, Brown J. Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: therapeutic synergy in genistein and β -lapachone combination treatment *Cancer Cell Int* 2004;4:5-13.

Lagrota MH, Wigg MD, Aguiar AN, Pinto AV, Pinto MCFR. Antiviral activity of naphthoquinones. I - Lapachol derivatives against enteroviruses. *Rev Latinoam Microbiol* 1986;28:221-225.

Lai CC, Liu TJ, Ho LK, Don MJ, Chau YP. β -Lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol Histopathol* 1998;13:89-97.

Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC. Chagas' disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Para, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73:193-204.

Lee JH, Cheong J, Park YM, Choi YH. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by beta-lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacol Res* 2005;51:553-560.

Lent H, Wygodzinky P. Revision of the Triatominae Hemiptera, Reduvidae and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Museum of Natural History* 1979;163:123-520.

Lewinsohn R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). *Jornal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)* 2005a; 11 a 17 de abril.

Lewinsohn R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte II). *Jornal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)* 2005b; 9 a 15 de maio.

Li CJ, Averboukh L, Pardee AB. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 1993b;268:22463-22468.

- Li CJ, Wang C, Pardee AB. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:3712-3715.
- Li CJ, Zhang LJ, Dezube BJ, Crumpacker CS, Pardee AB. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993a;90:1839-1842.
- Li Y, Sun X, LaMont JT, Pardee AB, Li CJ. Selective killing of cancer cells by β -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2674-2678.
- Li Z, Fennie MW, Ganem B, Hancock MT, Kobaslija M, Rattendi D, et al. Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:251-254.
- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EEC, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 2005;21:363-369.
- Liu TJ, Lin SY, Chau YP. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activation attenuates β -lapachone-induced necrotic cell death in human osteosarcoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;182:116-125.
- Lopes CC, Lopes RSC, Pinto AV, Costa PRR. Efficient synthesis of cytotoxic quinones: 2-Acetyl-4H,9H-naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione. *J Heterocyclic Chem* 1984;21:621-622.
- Lopes ER, Chapadeiro E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana *In*: Dias & Coura, orgs. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 67-81.
- Lopes JN, Cruz FS, Do Campo R, Vasconcellos ME, Sampaio MCR, Pinto AV, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1978;72:523-531.
- Lopetegui T, Sosa Miatello C. Efecto inhibitorio de la sangre sobre la actividad letal anticrithidia *Trypanosoma cruzi* de menandione *in vitro*. *Rev Soc Arg Biol* 1961;37:134-140.
- Lu HG, Zhong L, Chang KP, Docampo R. Intracellular Ca^{2+} pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J Biol Chem* 1997;272:9464-9473.

- Lu HG, Zhong L, De Souza W, Benchimol M, Moreno S, Docampo R. Ca²⁺ content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* 1998;18:2309-2323.
- Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res* 1997;232:339-348.
- Macêdo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas *In*: Dias & Coura, orgs. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 383-409.
- Manna SK, Gad YP, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis by β -lapachone. *Biochem Pharmacol* 1999;57:763-774.
- Martinez-Palomo A, De Souza W, Gonzalez-Robles A. Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biol* 1976;69:507-513.
- Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, et al. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;86:101–106.
- Maya JD, Bollo S, Nunez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, et al. *Trypanosoma cruzi*: Effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochem Pharmacol* 2003;65:999-1006.
- McKerrow JH. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: Insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int J Parasitol* 1999;29:833-837.
- Meirelles MNL, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural cytochemistry of mitochondrial enzymes. *Exp Parasitol* 1980;81:373-381.
- Meirelles MN, De Souza W. Interaction of lysosomes with endocytic vacuoles in macrophages simultaneously infected with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *J Submicrosc Cytol* 1983;15:889-896.
- Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, Barbosa HS. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *Eur J Cell Biol* 1986;41:198-206.
- Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol* 1978;64:475-482.

- Miranda K, Benchimol M, Docampo R, de Souza W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res 2000;86:373-384.
- Molina Portela MP, Fernandez Villamil SH, Perissinotti LJ, Stoppani AOM. Redox cycling of *o*-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production. Biochem Pharmacol 1996;52:1875-1882.
- Moncayo A. Chagas disease: Current Epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98:577-591.
- Monks TJ, Hanslik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. Quinone chemistry and toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1992;112:2-16.
- Montalvetti A, Bailey BN, Martin MB, Severin GW, Oldfield E, Docampo R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. J Biol Chem 2001;276:33930-33937.
- Morello A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol 1988;90C:1-12.
- Morello A, Pavani M, Garbarino JA, Chamy MC, Frey C, Mancilla J, et al. Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 1995;112:119-128.
- Moreno SNJ, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AOM. Different behaviour of benznidazol as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch Biochem Biophys 1982;218:585-591.
- Moura KC, Emery FS, Neves-Pinto C, Pinto MCFR, Dantas AP, Salomão K, et al. Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. J Braz Chem Soc 2001;12:325-338.
- Moura KC, Salomão K, Menna-Barreto RFS, Emery FS, Pinto MCFR, Pinto AV, et al. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazoles from β -lapachone. Eur J Med Chem 2004;39:639-645.
- Moya PR, Moretti ERA. Doença de Chagas congênita. In: Dias & Coura, orgs. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 383-410.
- Munday R. Autoxidation of naphthoquinones: effects of pH, naphthoquinones and superoxide dismutase. Ree Rad Res 2000;32:245-253.
- Munday R, Smith BL, Fowke EA. Haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in rats. J Appl Toxicol 1991;11:85-90.
- Munday R, Fowke EA, Smith BL, Munday CM. Comparative toxicity of alkyl-1,4-naphthoquinones in rats: relationship to free radical production *in vitro*. Free Radic Biol Med 1994;16:725-731.

- Munday R, Smith BL, Munday CM. Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones in rats. *Chem-Biol Interact* 1995a;98:185-192.
- Munday R, Smith BL, Munday CM. Toxicity of 2,3-dialkyl-1,4-naphthoquinones in rats: Comparison with cytotoxicity *in vitro*. *Free Radic Biol Med* 1995b;19:759-765.
- Navarro M, Cisneros-Fajardo EJ, Lehmann T, Sanchez-Delgado RA, Atencio R, Silva P, et al. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 6. Synthesis and characterization of new copper(II) and gold(I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg Chem* 2001;40:6879-6884.
- Neves Pinto C. Quinonas bioativas de *Tabebuia*: Reatividade e potencial na síntese de heterocíclicos. Rio de Janeiro; 1998. Doutorado [Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais] – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Neves Pinto C, Pinto MCFR, Emery FS, De Moura KCG, Pinto AVP. Synthesis of some naturally occurring naphthoquinones from *Paratecoma* and *Tabebuia* sp. *An Acad Bras Cien* 1997;69:15-18.
- Neves-Pinto C, Dantas AP, Moura KC, Emery FS, Polequevitch PF, Pinto MCFR, et al. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneim-Forsch* 2000;50:1120-1128.
- Neves-Pinto C, Malta VR, Pinto MCFR, Santos RH, De Castro SL, Pinto AV. A trypanocidal phenazine derived from β -lapachone. *J Med Chem* 2002;45:2112-2115.
- Nishioka SA, Ferreira MS, Rocha A, Burgarelli MK, Silva AM, Duarte MI, et al. Reactivation of Chagas' disease successfully treated with benznidazole in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;88:493-496.
- O'Brien PJ. Molecular mechanism of quinone cytotoxicity. *Chem-Biol Interact* 1991;80:1-41.
- OMS. Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of blood UNDP/WB/TDR. 1984; Genebra.
- OMS. Chagas disease Thirteenth Programme Report UNDP/WB/TDR. 1997; Genebra. p. 112-123.
- OMS. Control of Chagas Disease. Technical Reports Series 2002;905:1-109.
- Ough M, Lewis A, Bey EA, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Boothman DA, et al. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. *Cancer Biol Ther* 2005;4:95-102.
- Park HJ, Ahn KJ, Ahn SD, Choi E, Lee SW, Williams B, et al. Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:212-219.

- Patai A. The chemistry of the quinoidal compounds. London: John Wiley Sons; 1974. p. 347.
- Paulino M, Iribarne F, Dubin M, Aguilera-Morales S, Tapia O, Stoppani AOM. The chemotherapy of Chagas' disease: an overview. *Mini-Rev Med Chem* 2005;5:499-519.
- Pereira NM, De Castro SL, Da Costa SCG, Rebello MA, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of membrane and flagellar fractions. *Exp Parasitol* 1978;46:225-234.
- Pink JJ, Wuerzberger-Davis S, Tagliarino C, Planchon SM, Yang X, Froelich CJ, et al. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;255:144-155.
- Pinto AV, Pinto MCFR, Oliveira CGT. Síntese das α - e β -nor-lapachonas, propriedades em meio ácido e reações com N-bromosuccinimida. *An Acad Brasil Ciências* 1982a;54:107-114.
- Pinto AV, Pinto MCFR, Aguiar MA, Capella RS. Transformações do lapachol em nafto-[1,2-b]-furanquinonas naturais. *An Acad Brasil Ciências* 1982b;54:115-118.
- Pinto AV, Pinto MCFR, Gilbert B, Pelegrino J, Mello RT. *Schistosoma mansoni*: Blockage of cercarial skin penetration by chemical agents I Naphthoquinones and derivatives. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1977;71:133-135.
- Pinto AV, Ferreira VF, Pinto MCFR, Mayer LU. Reaction of 2-amino-1,4-naphthoquinone derivatives with dimethyl acetylenedicarboxylate. *Synthetic Comm* 1985;15:1181-1189.
- Pinto AV, Pinto MCFR, Lagrota MH, Wigg MD, Aguiar AN. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses. *Rev Latinoam Microbiol* 1987a;29:15-20.
- Pinto AV, Ferreira VF, Capella RS, Gilbert B, Pinto MCR, Da Silva JS. Activity of some naphthoquinones on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1987b;81:609-610.
- Pinto AV, Neves Pinto C, Pinto MCFR, Santa Rita RM, Pezzella C, De Castro SL. Trypanocidal activity of synthetic heterocyclic derivatives from active quinones from *Tabebuia* sp. *Arzneim-Forsch* 1997a;47(I):74-79.
- Pinto AV, Neves Pinto C, Pinto MCFR, Emery FS, De Moura KCG, Carvalho CEM, et al. Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones. *Heterocycles* 1997b;45:2431-2436.

- Pinto MCFR, Pinto AV, Oliveira CGT. Síntese de naftoquinonas naturais a partir do lapachol. An Acad Brasil Ciências 1980;52:481-482.
- Planchon SM, Wuerzberger-Davis SM, Pink JJ, Robertson KA, Bornmann WG, Boothman DA. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. Oncol Rep 1999;6:485-492.
- Planchon SM, Pink JJ, Tagliarino C, Bornmann WG, Varnes ME, Boothman DA. β -Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. Exp Cell Res 2001;267:95-106.
- Polak A, Richle R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann Trop Med Parasitol 1978;72:228-232.
- Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. Eur J Cell Biol 2000;79:858-869.
- Powis G. Metabolism and reactions of quinoid anti-cancer agents. Pharmacol Ther 1987;35:57-162.
- Rao MM, Kingston DGI. Plant anticancer agents. XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. J Nat Prod 1982;45:600-604.
- Rassi A. Tratamento etiológico da doença de Chagas. Arq Bras Cardiol 1982;38:277-281.
- Reinicke KE, Bey EA, Bentle MS, Pink JJ, Ingalls ST, Hoppel CL, et al. Development of β -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 levels. Clin Cancer Res 2005;11:3055-3064.
- Repetto Y, Opazo E, Maya JD, Agosin M, Morello A. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*. Effect of drug. Comp Biochem Physiol 1996;115B:281-285.
- Rezende JM. The digestive tract in Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984;79(suppl):97-106.
- Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. Rev Soc Bras Med Trop 1998;31:301-314.
- Riou GF, Gabillot M, Douc-Rassy S, Kayser AW. DNA topoisomerase(s) of trypanosomes: inhibitory effect of some chemicals In: Agabian E, org. Molecular biology of host-parasites interactions. New York: A R Less; 1984. p. 279-289.
- Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 2002;2:43-52.
- Rodriguez JB. Specific molecular targets to control tropical diseases. Curr Pharm Des 2001;7:1105-1116.

- Rothhammer F, Allison MJ, Nuñez L, Staden V, Arriza B. Chagas disease in pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol* 1985;68:495-498.
- Rothman JE, Wieland FT. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 1996;272:227-234.
- Roush WR, Hernandez AA, McKerrow JH, Selzer PM, Hansell E, Engel JC. Design, synthesis and evaluation of D-homophenylalanyloxysuccinate inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Tetrahedron* 2000;56:9747-9762.
- Sabino EC, Goncalves TT, Salles NA, Silva GR, Chamone DF. Trends in the prevalence of Chagas' disease among first-time blood donors in São Paulo, Brazil. *Transfusion* 2003;43:853-856.
- Salmon-Chemin L, Buisine E, Yardley V, Kohler S, Debreu MA, Landry V, et al. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. *J Med Chem* 2001;44:548-565.
- [Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, De Castro SL](#). Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:780-784.
- Santos AF, Ferraz PA, Pinto AV, Pinto MC, Goulart MO, Sant'Ana AE. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int J Parasitol* 2000;30:1199-1202.
- Santos AF, Ferraz PA, de Abreu FC, Chiari E, Goulart MO, Sant'Ana AE. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. *Planta Med* 2001;67:92-93.
- Santos MGM, Lagrota MHC, Wigg MD, Miranda MMF, Pinto AV, Pinto MCFR. Atividade antivirótica de naftoquinonas. III - Derivados 1,2 e 1,4-naftoquinônicos frente a ribovirus envelopados. *Rev Bras Farm* 1992;73:78-80.
- Saravanamuthu A, Vickers TJ, Bond CS, Peterson MR, Hunter WN, Fairlamb AH. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. *J Biol Chem* 2004;279:29493-29500.
- Sartori AM, Shikanai-Yasuda MA, Amato Neto V, Lopes MH. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients. *Clin Infect Dis* 1998;26:177-179.
- Sartori AM, Caiaffa-Filho HH, Bezerra RC, do S Guilherme C, Lopes MH, Shikanai-Yasuda MA. Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:521-523.
- Schenkman S, Yoshida N, Cardoso-de-Almeida ML. Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1988;29:141-151.
- Schmunis GA, Zicker F, Cruz JR, Cuchi P. Safety of blood supply for infectious diseases in Latin American countries, 1994-1997. *Amer J Trop Med Hyg* 2001;65:924-930.
- Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 1999;42:1-27.

- Schürch AR, Wehrli W. β -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase- α . Inhibitory effect, thiol dependence and specificity. *Eur J Biochem* 1978;84:197-205.
- Scott DA, Moreno SN, Docampo R. Ca^{2+} storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity. *Biochem J* 1995;310:789-794.
- Scott DA, Docampo R, Dvorak JA, Shi S, Leapman RD. *In situ* compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1997;272:28020-28029.
- Scott DA, De Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, et al. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1998;273:22151-22158.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:117-143.
- Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Epidemiology of the first autochthonous cases of Chagas' disease recorded in Belém, Pará, Brazil. *Rev Saúde Pública* 1969;3:153-157.
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:40-79.
- Shikanai Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991;33:351-357.
- Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Suppl 1):139-141.
- Soares MJ, De Souza W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1988;20:349-361.
- Soares MJ, De Souza W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1991;77:461-468
- Soares MJ, Souto-Pradrón T, De Souza W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 1992;102:157-167.
- Soares MJ, Souto-Pradrón T, Bonaldo MC, Goldenberg S, De Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1989;75:522-527.
- Soeiro MN, Silva-Filho FC, Meirelles MN. The nature of anionic sites and the endocytic pathway in heart muscle cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1994;1:121-130.

Solari A, Saavedra H, Sepulveda C, Oddó D, Acuña G, Labarca J, et al.

Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS. Clin Inf Dis 1993;16:255-259.

Souza DH, Garratt RC, Araújo AP, Guimarães BG, Jesus WD, Michels PA, et al. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. FEBS Lett 1998;424:131-135.

Souza LC, dos Santos AF, Sant'Ana AE, de Oliveira Imbroisi D. Synthesis and evaluation of the molluscicidal activity of the 5,6-dimethyl-dihydro-pyran-2,4-dione and 6-substituted analogous. Bioorg Med Chem 2004;12:865-869.

Spectroscopy Now. John Wiley & Sons [online]. Chichester, United Kingdom; 2005. [capturado em 26 de julho de 2005]. Disponível em: http://www.spectroscopynow.com/ftp_images/Digests34_Chagas.jpg

Stoppani AOM. The chemotherapy of Chagas disease. Medicina (Buenos Aires) 1999;59:147-165.

Superintendência de controle de endemias do Estado de São Paulo [online]. São Paulo, Brasil; 2005. [capturado em 26 de julho de 2005]. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/sobre/imagens_historicas/chagas/chagas26.html

Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA. Calcium is a key signaling molecule in β -lapachone-mediated cell death. J Biol Chem 2001;276:19150-19159.

Tagliarino C, Pink JJ, Reinicke KE, Simmers SM, Wuerzberger-Davis SM, Boothman DA. μ -Calpain activation in β -lapachone-mediated apoptosis, Cancer Biol Ther 2003;2:141-152.

Tang DG, Porter AT. Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. Prostate 1997;32:284-293.

Tapia RA, Alegria L, Pessoa CD, Salas C, Cortes MJ, Valderrama JA, et al. Synthesis and antiprotozoal activity of naphthofuranquinones and naphthothiophenequinones containing a fused thiazole ring. Bioorgan Med Chem 2004;11:2175-2182.

Thomas SM, McPhee DG. Crystal violet: A direct- acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. Mutation Res 1984;140:1165-1167.

Thompson RH. Naturally occurring quinones. New York: Academic Press; 1971.

Tomimori-Yamashita J, Deps PD, Almeida DR, Enokihara MM, De Seixas MT, Freymuller E. Cutaneous manifestation of Chagas' disease after heart transplantation: Successful treatment with allopurinol. Br J Dermatol 1997;37:626-630.

- Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrice MC, Dramaix M, et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:201-209.
- Trouiller P, Rey JL, Bouscharain P. Pharmaceutical development concerning diseases predominating in tropical regions: the concept of indigent drugs. *Ann Pharm Fr* 2000;58:43-46.
- Trouiller P, Olliaro P, Torrele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet* 2002;359:2188-2194.
- Ullman B, Carter D. Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases of the pathogenic haemoflagellates. *Int J Parasitol* 1997;27:203-213.
- Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências da USP [online]. São Paulo, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://dreyfus.ib.usp.br/bio435/bio4351999/chavemoa/mar.html>
- Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 1997;114(Suppl):S91-99.
- Urbina JA. Chemotherapy of Chagas' disease: The how and the why. *J Mol Med* 1999;77:332-338.
- Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 2003;19:495-501.
- Urbina JA, Concepcion JL, Rangel S, Visbal G, Lira R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:35-45.
- Vatarunakamura C, Ueda-Nakamura T, de Souza W. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:227-230.
- Vercesi AE, Docampo R. Sodium-proton exchange stimulates Ca²⁺ release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 1996;315:265-270.
- Verma RP. Understanding topoisomerase I and II in terms of QSAR. *Bioorg Med Chem* 2005;13:1059-1067.
- Vinhaes MC, Schofield CJ. Trypanosomiasis control: surmounting diminishing returns. *Trends Parasitol* 2003;19:112-113.
- Webster P, Grab DJ. Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferrin-gold in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 1988;106:279-288.
- Weller M, Winter S, Schmidt C, Esser P, Fontana A, Dichgans J, et al. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and of CD95-mediated apoptosis by camptothecin and β -lapachone. *Int J Cancer* 1997;73:707-714.

- Williams BL, Goodwin TW, Ryley JF. The sterol content of some protozoa. *J Protozool* 1966;13:227-230.
- Woo HJ, Choi YH. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β -lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. *Int J Oncol* 2005;26:1017-1023.
- Zani CL, Fairlamb AH. 8-Methoxy-naphtho[2,3-b]thiophen-4,9-quinone, a non-competitive inhibitor of trypanothione reductase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:565-568.
- Zhai L, Blom J, Chen M, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2742-2748.
- Zuccotto F, Brun R, Gonzalez Pacanowska D, Ruiz Perez LM, Gilbert IH. The structure-based design and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorg Med Chem Lett* 1999;9:1463-1468.
- Zuccotto F, Zvelebil M, Brun R, Chowdhury SF, DiLucrezia R, Leal I, et al. Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Eur J Med Chem* 2001;36:395-405.

8. ANEXO 1

Moura KC, Salomão K, Menna-Barreto RFS, Emery FS, Pinto MCFR, Pinto AV, et al. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazoles from β -lapachone. *Eur J Med Chem* 2004;39:639-45.

9. ANEXO 2

Pinto AV, Menna-Barreto RFS, De Castro SL. Naphthoquinones isolated from *Tabebuia*: a review about the synthesis of heterocyclic derivatives, screening against *Trypanosoma cruzi* and correlation structure-trypanocidal activity. Govil JN, org. Recent Progress in Medicinal Plants. Houston: Studium Press; 2005. (No prelo).

----- Original Message -----

From: [DR. J. N. GOVIL](#)
To: sldecastro@globo.com
Sent: Monday, November 21, 2005 4:59 AM
Subject: re

Dear Dr. Solange Lisboa de Castro,

Your article entitled "Naphthoquinones isolated from *Tabebuia*: a review about the synthesis of heterocyclic derivatives, screening against *Trypanosoma cruzi* and correlation structure-trypanocidal activity" will be published in Vol 16 of the series "Recent Progress in medicinal Plants". The book will be released during early months of Year 2006.

Thanking you,

With regards
Sincerely yours

J.N.Govil

Our Mailing Address:-
Dr.J.N.Govil
Principal Scientist & Chief Editor
"Recent Progress in Medicinal Plants"
Division of Genetics
Indian Agricultural Research Institute
New Delhi-110 002 (India)
Mobile #9891291964
Fax: 91-11-28716134

Naphthoquinones isolated from *Tabebuia*: a review about the synthesis of heterocyclic derivatives, screening against *Trypanosoma cruzi* and correlation structure- trypanocidal activity

Antônio Ventura Pinto^a, Rubem F. S. Menna-Barreto^b, Solange Lisboa de Castro^{b,*}

^aNúcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944-970, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bLaboratório de Biologia Celular, DUBC, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

***To whom correspondence should be addressed.**

*Correspondence and reprints: Dr. S.L. de Castro, Laboratório de Biologia Celular, DUBC

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365 – 21045-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. Phone: 00 55 21 2598-4624. Fax: 00 55 21 2260-4434. Email:

solange@ioc.fiocruz.br

Abstract

Naphthoquinones isolated from the wood of trees of the families Bignoniaceae and Verbenaceae have been subject of a program on the chemistry of natural products active against endemic diseases. In this review we briefly described the synthesis of imidazole, oxazole, phenoxazine, indole, dipyrane and cyclopentene derivatives (n=51) and their activity, together with those of lapachol, β -lapachone, nor-lapachol and nor- β -lapachone, against *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease. We also discuss the influence of the chemical structure on the trypanocidal effect. The overall analysis corroborates the tendency of trypanocidal activity in compounds in which aromatic structures were introduced at the imidazole ring linked to a naphthopyranic structure corresponding to β -lapachone.

Keywords: naphthoquinones, heterocycles, *Tabebuia*, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Universitária José Bonifácio/UFRJ.

1. Introduction

1.1. Chagas disease and its treatment

Chagas disease, endemic in Latin America, is caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi* and affects about 16-18 million people (WHO, 1997). The life cycle of *T. cruzi* involves a hematophagous triatomine insect, a vertebrate host and different forms of the parasite. Briefly, a bloodstream trypomastigote ingested by the insect differentiates into epimastigote, which proliferates and in the posterior intestine, differentiates to a metacyclic form. This infective form invades the vertebrate cell, undergoes differentiation to intracellular amastigote, which proliferates and then suffers transformation to trypomastigote, the form that disseminates the infection. In humans, during the acute phase of Chagas disease, in absence of specific treatment the symptoms persist for about two months, with a mortality of 2 to 8%, especially among children. In the chronic phase, most patients remain asymptomatic, with about 20% of the cases developing the symptoms characteristic of this phase, namely cardiac, digestive or neurologic disturbances (Brenner et al., 1999). The transmission of this disease occurs mostly by vector, followed by blood transfusion and congenital route (Prata, 2001), and in some instances by laboratory accident, organ transplantation and ingestion of infected food or contaminated insect (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Herwaldt, 2001; Camandaroba et al., 2002). Advances in vector control in the South Cone countries have decreased the incidence of new infections in 94% (Schofield & Dias, 1999; Moncayo, 2003). However, we are still challenged by two critical problems: the treatment of chronic patients and the high level

of acute cases in some Latin American countries (Medrano-Mercado et al., 1996). There is a recommendation by the WHO (1984) for the use of the dye crystal violet in hemotherapeutic centres in endemic areas.

Efforts have been addressed to find more efficient and safe agents for the treatment of this disease since the only available drug, the nitroderivative benznidazole, presents severe side effects and its efficacy depends on the susceptibility of different parasite populations (Coura & De Castro, 2002; Urbina & Docampo, 2003). Due investment costs and the lack of security in developing countries, the pharmaceutical industry has little interest in the development of drugs for neglected diseases (Trouiller et al., 2000). For example, from the 1393 new drugs developed between 1975 and 1999 only 1% was directed to tropical diseases and tuberculosis (Trouiller et al., 2002).

The strategy for the development of new chemotherapeutic agents against Chagas disease is the search of compounds that could lead to eradication of the parasite in the vertebrate host, by acting upon intracellular amastigote forms and bloodstream trypomastigotes.

1.2. Naphthoquinones

Naphthoquinones are compounds present in different families of plants; their molecular structures endow them with redox properties, being involved in different biological oxidative processes. In folk medicine, especially among Indian populations plants containing naphthoquinones have been employed for the treatment of different diseases, such as cancer (Arenas, 1977; Bastien et al., 1983). The biological redox cycle of quinones can be initiated by one electron

reduction leading to the formation of semiquinones, unstable intermediates that react rapidly with molecular oxygen generating free radicals. Another alternative is the reduction by two electrons, mediated by DT-diphorase, leading to the formation of hydroquinone. This latter pathway *in vivo* may lead either to detoxification or to activation, depending on differences in the rate or mechanism of autoxidation of the formed hydroquinones (O'Brien, 1991; Koster, 1991; Munday, 2000, 2001, 2004).

1.3. Biological effects of lapachol, β -lapachone and analogues

Lapachol (2-hydroxy-3-(3'-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone) is easily isolated from the heartwood of trees of the Bignoniaceae family, abundant in tropical rain forests, and α -lapachone (2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-5,10-dioxy-naphth[2,3-*b*] pyrane) and β -lapachone (2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-5,6-dioxy-naphth[1,2-*b*] pyrane) are present in small amounts. In Brazil more than 46 types of such woods, popularly known by the name of "ipes" (*Tabebuia sp.*), have been described. The microbicidal activity of lapachol has been described for the first time by Gonçalves Lima et al. (1962), in Brazil, and subsequent studies by other groups reported a variety of biological activities of lapachol, β -lapachone, and analogues, which involves as first activating step the bioreduction of naphthoquinones. These compounds act as inhibitors of electron transport, uncouplers of oxidative phosphorylation, DNA intercalating agents, and as producers of reactive oxygen radicals (Monks et al., 1992; O'Brien, 1991; Goulart et al. 2003). These naphthoquinones have been described as being active against bacteria and fungi (Gonçalves Lima et al., 1962; D'Albuquerque et al., 1972; Guiraud et al.,

1994), viruses (Lagrota et al., 1986; Pinto et al., 1987a; Santos et al., 1992) and tumor lineages (Gonçalves Lima et al., 1971; D'Albuquerque et al., 1972; Lopes et al., 1984).

Great effort aimed the investigation of the anti-tumoral activity of β -lapachone, which in different tumoral cells induced apoptosis (Li et al., 1995; Manna et al., 1999; Don et al., 2001; Planchon et al., 2001; Choi et al., 2003; Tagliarino et al., 2003; Kumi-Diaka et al., 2004; Ough et al., 2005) and inhibited topoisomerases, enzymes involved in the processes of replication, transcription and mitosis (Li et al., 1993; Chau et al., 1998; Hueber et al., 1998; Bailly, 2000; Krishnan & Bastow, 2001; Verma, 2005). Due to the increasing number of reports about the activity of β -lapachone against a wide variety of tumor cells, by inhibition of topoisomerases and induction of apoptosis, Dubin et al. (2001) pointed out the potential of clinical applications of this naphthoquinone.

Previous reports showed that against *T. cruzi* epimastigotes, β -lapachone increases the generation of reactive oxygen species, through formation of the semiquinone radical, leading to lipid peroxidation and inhibition of nucleic acid and protein synthesis (Boveris et al., 1978; Cruz et al., 1978; Docampo et al., 1978; Gojman & Stoppani, 1985; Molina-Portela et al., 1996; Goulart et al., 1997). At ultrastructural level, β -lapachone-treated parasites presented alterations in nuclear, mitochondrial and plasma membranes, as well as alterations in the chromatin pattern, consistent with the measured inhibition of glucose and pyruvate oxidation due to decrease in ATP concentration (Docampo et al., 1977). 3-Allyl- β -lapachone was active against trypomastigotes, being suggested as alternative compound for crystal violet for blood prophylaxis in endemic areas of Chagas

disease (Gonçalves et al., 1980).

Due to the the easy access to natural sources of quinones from Brazilian flora, and the synthetic alternative routes previously developed by our group for the reactivity of quinoidal carbonyl towards nucleophilic agents (Cruz et al., 1977; Pinto et al., 1977; 1982, 1985, 1997a; Lopes et al., 1984; Ferreira et al., 1987; Chaves et al., 1990), we took naphthoquinones as starting points for medicinal chemistry studies.

In the present review, we describe the synthesis of 9 naphthoquinones and 54 derivatives obtained from the reaction of naphthoquinones with common reagents from the heterocyclic chemistry, leading to oxazolic, imidazolic, phenoxazolic, imidazolic and phenazinic compounds and the screening of their activity, together with those of the original naphthoquinones, against trypomastigotes of T. cruzi, associating the chemical structure with the trypanocidal activity (Pinto et al., 1997b; Neves-Pinto et al., 2000, 2002; Moura et al., 2001, 2004).

2. Materials and Methods

2.1. Original quinones

Lapachol (**1**) was extracted from the heartwood *Tabebuia* sp. (*Tecoma*) and purified by a series of recrystallizations. Through cyclization in an acid medium of its isoprenyl lateral chain, by nucleophilic attack of oxygen, the heterocyclic naphthoquinones β -lapachone (**2**) and α -lapachone (**3**) were obtained, respectively in the presence of HCl and sulfuric acid. Nor- β -lapachone (**4**) was obtained as previously described (Pinto et al., 1982). Nor-lapachol (**5**) was obtained from lapachol (**1**) by Hooker oxidation and through its cyclization

reaction, using sulfuric acid in acetic acid. Methoxy- β -lapachol (**6**) was obtained by methoxylation of lapachol (**1**) with diazomethane. Lawsone (**7**), the dye principle from *Lausonia alba*, was prepared by hydrolysis and oxidation of the leucotriacetate obtained by Thiele acetylation of 1,4-naphthoquinones. O-allyl lawsone (**8**) and C-allyl lawsone (**9**) were prepared by alkylation of the silver salt of **6** with allyl bromide. The structures are displayed in **Scheme 1**.

2.2. Synthesis of derivatives from naphthoquinones

The routes and chemical structures which resulted from the functionalization of 1,2-quinoidal moiety system are presented in **Scheme 2**. The routes I-VII represent the modifications which occur in compounds **10-63** (**Schemes 3-5**), depending on the original quinone, the other reagent and reaction conditions (Pinto et al., 1997b; Neves-Pinto et al., 2000; Moura et al., 2001, 2004). Briefly, naphthooxazoles (route I) and naphthoimidazoles (route II) were obtained from the reaction of **1**, **2** or **4**, in acetic aldehyde with the desired aldehyde, with slow addition at 70° C of ammonium acetate followed by reflux, being the end of the reaction monitored by thin layer chromatography. Compound **14** was easily prepared from **12** by acetylation with acetic anhydride/pyridine. From the reaction of **1** with benzaldehyde and ammonium acetate two compounds were obtained after fractionation by column chromatography, using as eluant a gradient mixture of hexane and ethyl acetate: **11** was obtained with 1% ethyl acetate and **22** with 5% ethyl acetate. From the reaction of diazomethane with **20** or **22** it was obtained, respectively, the oxazoles **21** and **23**. When **2** or **4** and glycine were added to anhydrous

pyridine it was obtained, respectively, the oxazoles **10** and **15**. When **2** was added to ethyl α -aminoacetate hydrochloride, after 3 h under reflux under O₂ atmosphere it was obtained the oxazole **17**. The reaction of 1,2-naphthoquinones with aromatic aldehydes lead to these two heterocyclics -naphthooxazoles and naphthoimidazoles-, which could be separated by column chromatography at different ranges of polarity. In several instances, the corresponding naphthoimidazole was obtained as the main product and was easily isolated by vacuum filtration and crystallisation in hexane/ethyl acetate.

A phenoxazine **54** was obtained by route **III** from the reaction of **1** in acetic acid with 2-aminephenol under reflux (Neves-Pinto et al., 2000). A dihydro indol **55** was obtained by route **IV** from the reaction of **2** in acetone, under N₂ atmosphere, with a concentrated solution of sodium hydroxide. The cyclopentenones **56** and **57** were obtained from **4** and **59** and **60** from **2** by route **V** from a solution of the naphthoquinone, to which sodium hydroxide was added, while **58** and **61** were obtained by route **VII**, through reaction of, respectively, **56** and **59** in toluene in the presence of some crystals of toluene sulfonic acid using a Dean-Stark system. The pyrans **62** and **63** were obtained by route **VII** from crystals of, respectively, **56** and **59** with addition of acetic acid under agitation at room temperature until total solubilization.

2.3. Assay for trypanocidal activity

Stock solutions of the naphthoquinones and their derivatives were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO), with the final concentration of the solvent never exceeding 0.1%. Experiments showed that in concentrations of up to 0.5%, DMSO had no deleterious effect on the parasites.

Bloodstream trypomastigotes (Y strain) were resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DME) plus 10% blood to a concentration of 5×10^6 cells/ml. This suspension (100 μ l) was added in a volume ratio 1:1 to the drugs, also diluted in DME at twice the final desired concentration, and the mixture was then incubated at 4° C. Some experiments were performed in DMES without addition of blood. Cell counts were performed after 24 h of incubation and the drug concentration corresponding to 50% parasite lysis was expressed as the IC₅₀.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical considerations

The main chemical characteristic of quinones is their reversible oxyreductive property, allowing them to be transformed into the reduced structurally related hydroquinols, which can be reverted to the starting quinone by oxidation. Due to this property, quinones are easily prepared from diphenols or monophenol with strong oxidant reagents. On the other hand, quinones also present a series of conspicuous chemical reactions, with countless rearrangements, fragmentations and coupling reactions, all of them already of consecrated knowledge in several areas of organic chemistry (Patai et al., 1974). In a continued effort for the utilisation of naturally occurring quinones we have been exploring the electrophilicity of 1,2-quinoidal carbonyls with reagents presenting heteroatom nucleophilic centres.

3.2. Correlations structure/activity against *T. cruzi*

3.2.1. Naphthoquinones

Comparing the activity against trypomastigotes of *T. cruzi* of the original

naphthoquinones (**Scheme 1**), it can be observed that: (a) **1** and **2** displayed similar activities that were somewhat higher than that of the standard compound crystal violet ($IC_{50}/24\text{ h} = 536.0 \pm 1.0\ \mu\text{M}$), whereas **3**, **4** and **7** were inactive; (b) the oxidative transformation of **1** to **5** led to reduction of activity, while the substitution of the hydroxyl by a methoxyl group (**6**) led to a 2.5-fold increase in the activity; (c) the introduction of an allyl group in **7**, inactive against the parasite, led to **8** and **9**, which presented activity similar to that of **1** and **2**. These results suggest that minor structural features involved with an increase in lipophylicity, such as the furane moiety (**1 versus 3**), the presence of methoxyl groups (**6 versus 1**), and of an aliphatic side chain (**8 and 9 versus 7**) led to an increase on the effect against *T. cruzi*. It is possible that a lipophylic character allows a better penetration of the compound through the plasma membrane of the parasite.

The higher activity of **2** in relation to **5** is in agreement with the results published by other groups, which, although employing different protocols, observed also that the trypanocidal activity of 1,2-quinones was higher than that of the corresponding 1,4 compounds (Lopes et al., 1978; Pinto et al., 1987b; Santana-Silva et al., 1992; Goijman & Stoppani, 1985; Goulart et al., 1997).

3.2.2. Naphthooxazoles

For the naphthooxazoles assayed (**10-23**), it can be observed that: (a) there is no correlation between biological activity and the type of the mono-oxygenated ring (pyrane versus furane) (**10 versus 18** or **12 versus 19**); (b) the introduction of an aromatic group linked to the oxazolic nucleus showed a great variability upon the trypanocidal activity, **11** (phenyl) and **15** (methylenedioxy) showing

activity higher than crystal violet, while different substituents in the phenyl group led to **12**, **13** and **14**, which were inactive; (c) the analysis of the naphthooxazoles obtained from **1** and presenting an isoprenic side chain suggests that a lipophylic characteristic, as discussed for naphthoquinones, introduced by this appendage, as well as the presence of a methoxyl or a phenyl group are factors that increase the trypanocidal activity (**21**, **22** and **23 versus 20**).

3.2.3. Naphthoimidazoles

A characteristic of the synthesized naphthoimidazoles **24-53** is that most of them present aromatic groups attached to the imidazole ring. Efforts have been made to obtain compounds with electron-releasing or electron-withdrawing groups linked to the phenyl substituent. It was determined that **26** to **33**, **36** and **52** were less active than the unsubstituted derivative (**25**) (Pinto et al., 1997b), suggesting that electronic factors on the phenyl group is not relevant for the biological effect. The compound **24** with an indolyl group linked to imidazolic ring was one of the most active against *T. cruzi*. In the naphthoimidazoles series, only **53** was synthesised from **4**, which, similarly to the original quinone, showed no effect against the parasite.

Two naphthoimidazoles with the nitrogen heteroatom located at a three-bonded distance from the imidazolic ring, **50** (R= 3'-pyridinyl) and **51** (R= 3'-quinolyl) were active against *T. cruzi*. These results are in accordance with our previous work that showed that the naphthoimidazole **24** with a 3'-indolic substituent at the imidazole moiety, was 34.8 times more active than crystal violet (Neves-Pinto et al., 2000). Our results led us to suggest that for enhancement of the

trypanocidal activity, the nitrogen atom of the heterocyclic substituent should be located three bonds-distant from its point of attachment to the pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazolic skeleton (**Scheme 6**).

3.2.4. Other heterocyclics

The other compounds synthesized from the naphthoquinones include a phenoxazine (**54**), an dihydro indol (**55**), several cyclopentenic (**56-61**) and pyranic (**62,63**) structures. Among the cyclopentenic derivatives obtained from the reaction of **2** or **4** with aliphatic acetoesters, only **60** obtained from ethyl acetoacetate was active, with a 9.6-fold increase in activity in comparison with crystal violet. Of the two pyranic compounds - **62** and **63** - obtained respectively from the cyclopentenones **56** and **59**, only the second one (**63**) was assayed against *T. cruzi*, but showed no activity. Among these heterocycles, since we have few compounds belonging to a same group, it was not possible to indicate any correlation between these structures and their trypanocidal activity. However, among the cyclopentenic derivatives, two correlations can be tentatively made: (a) the presence of pyrane ring led to a compound more active than the corresponding one with a furane (**60 versus 57**); (b) the presence of a carboxyethyl on the pyranic ring led to higher activity when compared to an acetyl (**60 versus 59**).

3.3. Interference of blood on the activity against *T. cruzi*

The inactivation of the trypanocidal activity of **1** by blood has been previously reported (Lopes et al., 1978). Thus, in the case of this quinone and also of the naphthoimidazoles **26**, **27**, **32**, **33**, **34** experiments were also performed in absence of blood. In the case of **1** the IC₅₀/24h

decrease from 391.5 ± 16.5 to 97.8 ± 2.2 μM, indicating a 4-fold increase of activity when the experiment was performed in absence of blood in comparison with the standard procedure (5% blood). For the naphthoimidazoles the increase in the trypanocidal activity was between threefold (**32**) to 252 times (**26**), indicating that blood components can protect trypomastigotes against the effects of **1** and of its derivatives. It was previously suggested that the inactivation of biological activity of naphthoquinones was due to their interaction with blood components, reducing the availability of free compound (Lopes et al., 1978). This inactivation could also be explained by the reduction of 1,2-naphthoquinones to hydroquinones mediated by the host DT-diaphorase, being this compound converted to non toxic conjugates (Munday, 2000). Another possibility for inactivation by blood could be a covalent chemical link between quinoidal carbonyl and free NH₂ residues of proteins. This type of reaction has been studied by our group, having shown the great reactivity of 1,2-quinones towards amines (Pinto et al., 1982, 1985, 1997a; Pinto MCFR et al., 1980; Lopes et al., 1984; Chaves et al., 1990). Knowledge about loss of the activity of quinones and their heterocyclic derivatives requires more investigation. Due to their different chemical structures, the mechanism of deactivation by blood should be different for the two groups of compounds.

4. Concluding remarks

As a mechanism of action of the synthesized naphthoimidazoles and naphthooxazoles we can exclude damage to the parasite caused by oxidative stress since, unlike the original naphthoquinones, these derivatives do not easily undergo redox

reactions. However it is possible that the compounds with a phenylic group attached to the imidazole ring, with smaller lipophylic phenyl substituted groups, could act through intercalation within apolar regions of proteins. On the other hand, for those with a heterocycle group attached to the ring, the planar substituted heterocyclic ring at the 2-position could facilitate a polar-polar interaction of the compounds with macromolecules through the non-bonding electron pair of the nitrogen atom.

The activity against *T. cruzi* of the synthesised compounds showed no uniform behaviour, in some cases higher, lower or similar to the activity of the original naphthoquinones from which they are obtained. Among the 30 naphthoimidazoles and 14 naphthoxazoles assayed, more than 50% of the compounds presented activity higher than crystal violet, indicating a trend of trypanocidal activity among these naphthalenic heterocyclics. The presence of imidazolic and oxazolic units increasing the trypanocidal activity could be due to structural factors, especially in the case of imidazoles. It is important to note that several substances described as trypanocidal agents, such as benzimidazole, contain basic imidazolic moieties (Winkelman et al., 1978; McCabe et al., 1983; Chabala et al., 1991; Nothenberg et al., 1991; Blandon et al., 1993; Sepulveda-Boza et al., 1996), corroborating the tendency of trypanocidal activity linked to the imidazolic skeleton. As a hypothesis it can be stated that this moiety is an architectural appendage group for the delineation of molecules of potential value for the chemotherapy of Chagas disease.

Three naphthoimidazoles derived **2**, with the aromatic moieties phenyl (**24**), 3-indolyl (**25**) and methyl-*p*-phenyl (**43**) linked to

the imidazole ring, showed the highest activity against the parasite. These results stimulated us to continuing the screening of naphthoimidazoles, synthesizing new derivatives with structures related to these active compounds, with aromatic group linked to the imidazolic nucleus, which is a promising route in the search of heterocyclic compounds with potential activity against *T. cruzi*. Experiments are underway aiming to further analyse the effect of **24**, **25** and **43** against *T. cruzi*, investigating the activity upon amastigote forms interiorised in host cells and the cytotoxicity of these compounds in mammalian cells, in order to understand their mechanism of action against the parasite.

References

- Arenas, P. 1987. Medicine and magic among the Maka Indians of the Paraguayan Chaco, *J. Ethnopharmacol.* 21 (3): 279-295
- Bailly, C. 2000. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs, *Curr. Med. Chem.* 7 (1): 39-58
- Bastien, J.W. 1983. Pharmacopeia of Qollahuaya Andeans, *J. Ethnopharmacol.* 8 (1): 97-111
- Blandon, R., C.M. Johnson, O. Sousa, I. Leandro, and J.F. Guevara. 1993. (1993) The clinical experience in Panama with metronidazole in treating Chagas' disease in the acute and chronic phases, *Rev. Med. Panama* 18 (2): 94-100
- Boveris, A., R. Docampo, J.F. Turrens, and A.O.M. Stoppani. 1978. Effect of β -lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*, *Biochem. J.* 175 (2): 431-439
- Brener Z., Z. Andrade, and M. Barral-Netto. 1999. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, RJ, Brasil, 431p.
- Camandaroba, E.L., C.M. Pinheiro Lima, and S.G. Andrade. 2002. Oral transmission of Chagas

- disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 44 (2): 97-103
- Chabala J.C., V.B. WQaits, T. Ikeler, A.A. Patchett, L. Payne, L.H. Peterson, R.A. Reamer, K. Hoogsteen, M. Wyvratt, W.L. Hanson, and M.H. Fisher. 1991. 1-(substituted)benzyl-5-aminimidazole-4-carboxamides are potent orally active inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in mice, *Experientia* 47 (1): 51-53
- Chau, Y.P., S.G. Shiah, M.J. Don, and M.L. Kuo. 1998. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (4): 660-670
- Chaves J.P., M.C.F.R. Pinto, and A.V. Pinto. 1990. Heterocyclics from quinones. I - Reaction of lapachol with primary alkyl amines, *J. Braz. Chem. Soc.* 1 (2): 21-27
- Choi, B.T., J. Cheong, and Y.H. Choi. 2003. β -Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF- κ B in human colon cancer HCT-116 cells, *Anticancer Drugs* 14 (10): 845-850
- Coura J.R., and S.L. De Castro. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (1): 3-24
- Cruz F.S., B. Gilbert, J.N. Lopes, R. Pinchin, and A.V. Pinto. 1977. The reaction of α - and β -lapachone with N-bromosuccinimide, *Rev. Latinoamer. Quím.* 8 (2): 138-140
- Cruz, F.S., R. Docampo, and W. DeSouza. 1978. Effect of β -lapachone on hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*, *Acta trop.* 35 (1): 35-40
- D'Albuquerque I.L., M.C.N. Maciel, A.R. Schuler, M.C. De Araújo, G.M. Maciel, M.S.B. Cavalcanti, D.G. Martins, and A.L. Lacerda. 1972. Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol), *Rev. Inst. Antibiot. (Univ. Recife)* 12 (1): 31-40
- Docampo, R., J.N. Lopes, F.S. Cruz, and W. DeSouza. 1977. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β -lapachone, *Exp. Parasitol.* 42 (1): 142-149
- Docampo, R., F.S. Cruz, A. Boveris, R.P. Muniz, and D.M. Esquivel. 1978. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in β -lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Arch. Biochem. Biophys.* 186 (2): 292-297
- Don, M.J., Y.H. Chang, K.K. Chen, L.K. Ho, and Y.P. Chau. 2001. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the β -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells, *Mol. Pharmacol.* 59 (4): 784-794
- Dubin M., S.H. Fernandez-Villamil, and A.O.M. Stoppani. 2001. Cytotoxicity of β -lapachone, an naphthoquinone with possible therapeutic use, *Medicina (B. Aires)* 61 (3): 343-350
- Ferreira V.F., A.V. Pinto, M.C.F.R. Pinto, and M.M. Silva. 1987. Selective aromatic reduction in pyranonaphthoquinone systems, *J. Chem. Res. Suppl.* 26
- Gojman, S.G., and A.O.M. Stoppani. 1985. Effects of beta-lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*, *Arch. Biochem. Biophys.* 240 (1): 273-280
- Gonçalves A.M., M.E.L. Vasconcellos, R. Docampo, F.S. Cruz, W. DeSouza, and W. Leon. 1980. Evaluation of the toxicity of 3-allyl-beta-lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1 (3): 167-176.
- Gonçalves-Lima O., I.C. D'Albuquerque, G.G. Lima, and M.H.D. Maia. 1962. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores, *Rev. Inst. Antibiot. (Univ. Recife)* 4 (1): 3-17
- Gonçalves-Lima, O., J.S. Coelho, I.C. D'Albuquerque, J.F. Mello, D.G. Martins, A.L. Lacerda, and M.A. Moraes-e-Souza. 1971. Antimicrobial substances from higher plants. Antimicrobial or antineoplastic activity of

- lawsona (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) in comparison with lapachol (2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butanyl)-1,4-naphthoquinone, *Rev. Inst. Antibiot. (Univ. Recife)* 11 (2): 21-26
- Goulart, M.O.F., C.L. Zani, J. Tonholo, L.R. Freitas, F.C. Abreu, A.B. Oliveira, D.S. Raslan, S. Starling, and E. Chiari. 1997. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (15): 2043-2048
- Goulart, M.O.F., P. Falkowski, T. Ossowski, A. Liwo. 2003. Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions, *Bioelectrochemistry* 59 (1/2): 85-87
- Guiraud, P., R. Steiman, G.M. Campos-Takaki, F. Seigle-Murandi, and M. Simeon de Buochberg. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone, *Planta Med.* 60 (4): 373-374
- Herwaldt, B.L. 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4): 659-688
- Hueber, A., P. Esser, K. Heimann, N. Kociok, S. Winter, and M. Weller. 1998. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and β -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells, *Exp. Eye Res.* 67 (5): 525-530
- Koster, A.S. 1991. Bioreductive activation of quinones: A mixed blessing, *Pharm. Weekbl. Sci.* 13 (3): 123-122
- Krishnan, P., and K.F. Bastow. 2001. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives α -lapachone, and β -lapachone, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47 (3): 187-198
- Kumi-Diaka, J., S. Saddler-Shawnette, A. Aller, and J. Brown. 2004. Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: therapeutic synergy in genistein and β -lapachone combination treatment, *Cancer Cell Int.* 4 (1): 5-13
- Lagrotta, M.H., M.D. Wigg, A.N. Aguiar, A.V. Pinto, and M.C.F.R. Pinto. 1986. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses, *Rev. Latinoam. Microbiol.* 28 (3): 221-225
- Li, C.J., L. Averboukh, and A.B. Pardee. 1993. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin, *J. Biol. Chem.* 268 (30): 22463-22468
- Li, C.J., C. Wang, and A.B. Pardee. 1995. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 55 (17): 3712-3715
- Lopes, J.N., F.S. Cruz, R. Docampo, M.E. Vasconcellos, M.C. Sampaio, A.V. Pinto, and B. Gilbert. 1978. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72 (6): 523-531
- Lopes, C.C., R.S.C. Lopes, A.V. Pinto, and P.R.R. Costa. 1984. Efficient synthesis of cytotoxic quinones: 2-Acetyl-4H,9H-naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione, *J. Heterocyclic Chem.* 21 (6): 621-622
- Manna, S.K., Y.P. Gad, A. Mukhopadhyay, and B.B. Aggarwal. 1999. Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis by β -lapachone, *Biochem. Pharmacol.* 57 (7): 763-774
- McCabe, R.E., F.G. Araújo, and J.S. Remington. 1983. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (5): 960-962
- Medrano-Mercado, N., M.R.M.P. Luz, F.T. Torrico, G.T. Tapiia, F. Van Leuven, and T.C. Araujo-Jorge. 1996. Acute phase proteins and serological profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54 (2): 154-161
- Molina-Portela, M.P., S.H. Fernandez-Villamil, L.J. Perissinotti, and A.O.M. Stoppani. 1996. Redox cycling of o-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production, *Biochem. Pharmacol.* 52 (12): 1875-1882
- Moncayo, A. 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of

- vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (5): 577-591
- Monks, T.J., R.P. Hanslik, G.M. Cohen, D. Ross, and D.G. Graham. 1992. Quinone chemistry and toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112 (1): 2-16
- Moura, K.C., F.S. Emery, C. Neves-Pinto, M.C.F.R. Pinto, A.P. Dantas, K. Salomão, S.L. De Castro, and A.V. Pinto. 2001. Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (3): 325-338
- Moura, K.C., K. Salomão, R.F.S. Menna-Barreto, F.S. Emery, M.C.F.R. Pinto, A.V. Pinto, and S.L. De Castro. 2004. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazoles from β -lapachone, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (7): 639-645
- Munday, R. 2000. Autoxidation of naphthohydroquinones: effects of pH, naphthoquinones and superoxide dismutase, *Free Rad. Res.* 32 (3): 245-253
- Munday, R. 2001. Concerted action of DT-diaphorase and superoxide dismutase in preventing redox cycling of naphthoquinones: an evaluation, *Free Rad. Res.* 35 (2): 145-158
- Munday, R. 2004. Activation and detoxification of naphthoquinones by NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *Methods Enzymol.* 382: 364-380
- Neves-Pinto, C., A.P. Dantas, K.C. Moura, F.S. Emery, P.F. Polequevitch, M.C.F.R. Pinto, S.L. De Castro, and A.V. Pinto. 2000. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy, *Arzneim-Forsch.* 50 (12): 1120-1128
- Neves-Pinto, C., V.R. Malta, M.C.F.R. Pinto, R.H. Santos, S.L. De Castro, and A.V. Pinto. 2002. A trypanocidal phenazine derived from β -lapachone, *J. Med. Chem.* 45 (10): 2112-2115
- Nothenberg, M.S., G.K.F. Takeda, and R. Najjar. 1991. Adducts of nitroimidazole derivatives with Rhodium(II) carboxylates: synthesis, characterization and evaluation of antichagasic activities, *J. Inorg. Biochem.* 42 (3): 217-229
- O'Brien, P.J. 1991. Molecular mechanism of quinone cytotoxicity, *Chem-Biol. Interact.* 80 (1): 1-41
- Ough, M., A. Lewis, E.A. Bey, M.M. Hinkhouse, J.M. Ritchie, D.A. Boothman, L.W. Oberley, and J.J. Cullen. 2005. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic Target NQO1, *Cancer Biol. Ther.* 4 (1): 95-102
- Patai, A. 1974. The chemistry of the quinoidal compounds. John Wiley, Sons, London, 347p.
- Pinto, A.V., M.C.F.R. Pinto, B. Gilbert, J. Pellegrino, and R.T. Mello. 1977. *Schistosoma mansoni*: blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. naphthoquinones and derivatives, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71 (2): 133-135
- Pinto, A.V., M.C.F.R. Pinto, and C.G.T. Oliveira. 1982a. Síntese das α - e β -nor-lapachonas, propriedades em meio ácido e reações com N-bromosuccinimida, *An. Acad. Brasil. Ciências* 54 (1): 107-114
- Pinto, A.V., V.F. Ferreira, M.C.F.R. Pinto, and L.U. Mayer. 1985. Reaction of 2-amino-1,4-naphthoquinone derivatives with dimethyl acetylenedicarboxylate, *Synthetic. Comm.* 15 (2): 1181-1189
- Pinto, A.V., M.C.F.R. Pinto, M.H. Lagrota, M.D. Wigg, and A.N. Aguiar. 1987a. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses, *Rev. Latinoam. Microbiol.* 29 (1): 15-20
- Pinto, A.V., V.F. Ferreira, R.S. Capella, B. Gilbert, M.C.F.R. Pinto, and J.S. Da Silva. 1987b. Activity of some naphthoquinones on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 (4): 609-610
- Pinto, A.V., C. Neves Pinto, M.C.F.R. Pinto, F.S. Emery, K.C.G. Moura, C.E.M. Carvalho, and I.M. Brinn. 1997a. Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones, *Heterocycles* 45 (3): 2431-2436

- Pinto, A.V., C. Neves Pinto, M.C.F.R. Pinto, R.M. Santa Rita, C. Pezzella, and S.L. De Castro. 1997b. Trypanocidal activity of synthetic heterocyclic derivatives from active quinones from *Tabebuia* sp, *Arzneim-Forsch.* 47 (1): 74-79
- Pinto, M.C.F.R., A.V. Pinto, and C.G.T. Oliveira. 1980. Síntese de naftoquinonas naturais a partir do lapachol, *An. Acad. Brasil. Ciências* 52 (3): 481-482
- Planchon, S.M., J.J. Pink, C. Tagliarino, W.G. Bornmann, M.E. Varnes, and D.A. Boothman. 2001. β -Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3, *Exp. Cell Res.* 267 (1): 95-106
- Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1 (2): 92-100.
- Santana-Silva, J., F. Ferrioli Filho, M.M. Kanesiro, V.F. Ferreira, S.C. Santos, C. Neves-Pinto, J.L. Fonseca, H.E. Mizrahy, B. Gilbert, M.C.F.R. Pinto, F.W. Ribeiro, and A.V. Pinto. 1992. Evaluation of some organic compounds on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87 (3): 345-351
- Santos, M.G.M., M.H.C. Lagrota, M.D. Wigg, M.M. F. Miranda, A.V. Pinto, and M.C.F.R. Pinto. 1992. Atividade antivirótica de naftoquinonas. III - Derivados 1,2 e 1,4-naftoquinônicos frente a ribovirus envelopados, *Rev. Bras. Farm.* 73 (1): 78-80
- Schofield, C.J., and J.C.P. Dias. 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease, *Adv. Parasitol.* 42: 1-27
- Sepulveda-Boza, S., and B. K. Cassels. 1996. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*, *Planta. Med.* 62 (2): 98-105
- Shikanai-Yasuda, M.A., C.B. Marcondes, L.A. Guedes, G.S. Siqueira, A.A. Barone, J.C. Dias, V. Amato-Neto, J.E. Tolezano, B.A. Peres, and E.R. Arruda Jr. 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 33(5): 351-357
- Tagliarino, C., J.J. Pink, K.E. Reinicke, S.M. Simmers, S.M. Wuerzberger-Davis, and D.A. Boothman. 2003. μ -Calpain activation in β -lapachone-mediated apoptosis, *Cancer Biol. Ther.* 2 (2): 141-152
- Trouiller, P., J.L. Rey, and P. Bouscharain. 2000. Pharmaceutical development concerning diseases predominating in tropical regions: the concept of indigent drugs, *Ann. Pharm. Fr.* 58 (1): 43-46.
- Trouiller, P., P. Olliaro, E. Torreele, J. Orbinski, R. Laing, and N. Ford. 2002. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure, *Lancet* 359 (9324): 2188-2194
- Urbina, J.A., and R. Docampo. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances, *Trends Parasitol.* 19 (11): 495-501
- Verma, R.P. 2005. Understanding topoisomerase I and II in terms of QSAR, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (4): 1059-1067
- WHO. 1984. Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of blood UNDP/WB/TDR, Geneve
- WHO. 1997. Chagas disease Thirteenth Programme Report UNDP/TDR, Geneve.
- Winkelmann, E., W. Raether, and A. Sinharay. 1978. Chemotherapeutically active nitro compounds. 4,5-Nitroimidazoles (Part II), *Arzneim-Forsch.* 28 (10): 351-366

Legends to the Schemes:

Scheme 1. Naphthoquinones assayed and their trypanocidal activity. The numbers in parentheses correspond to the mean \pm standard deviation of $IC_{50}/24$ h expressed in μ M, for the lytic effect on trypomastigotes of *T. cruzi*.

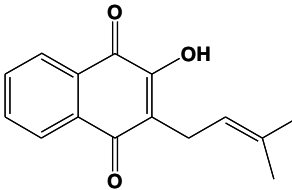
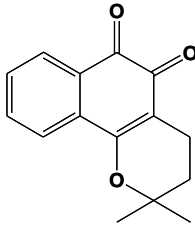
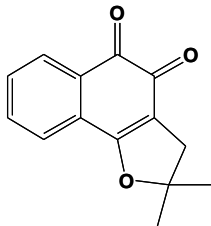
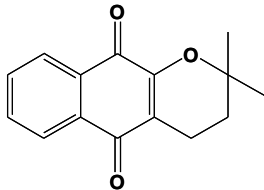
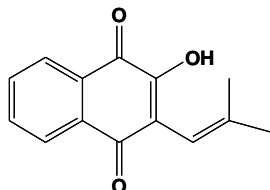
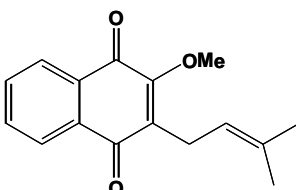
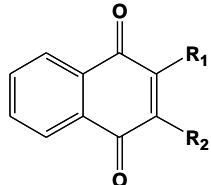
Scheme 2. Chemical routes to naphthoxazoles (route **I**), naphthoimidazoles (route **II**), phenoxazine (route **III**), indole (route **IV**), cyclopentene (routes **V**, **VII**) and pyran derivatives (route **VI**) from 1,2-quinones.

Scheme 3. Naphthoxazoles assayed and their trypanocidal activity. The numbers in parentheses correspond to the values of $IC_{50}/24$ h expressed in μ M, for the lytic effect on trypomastigotes of *T. cruzi*.

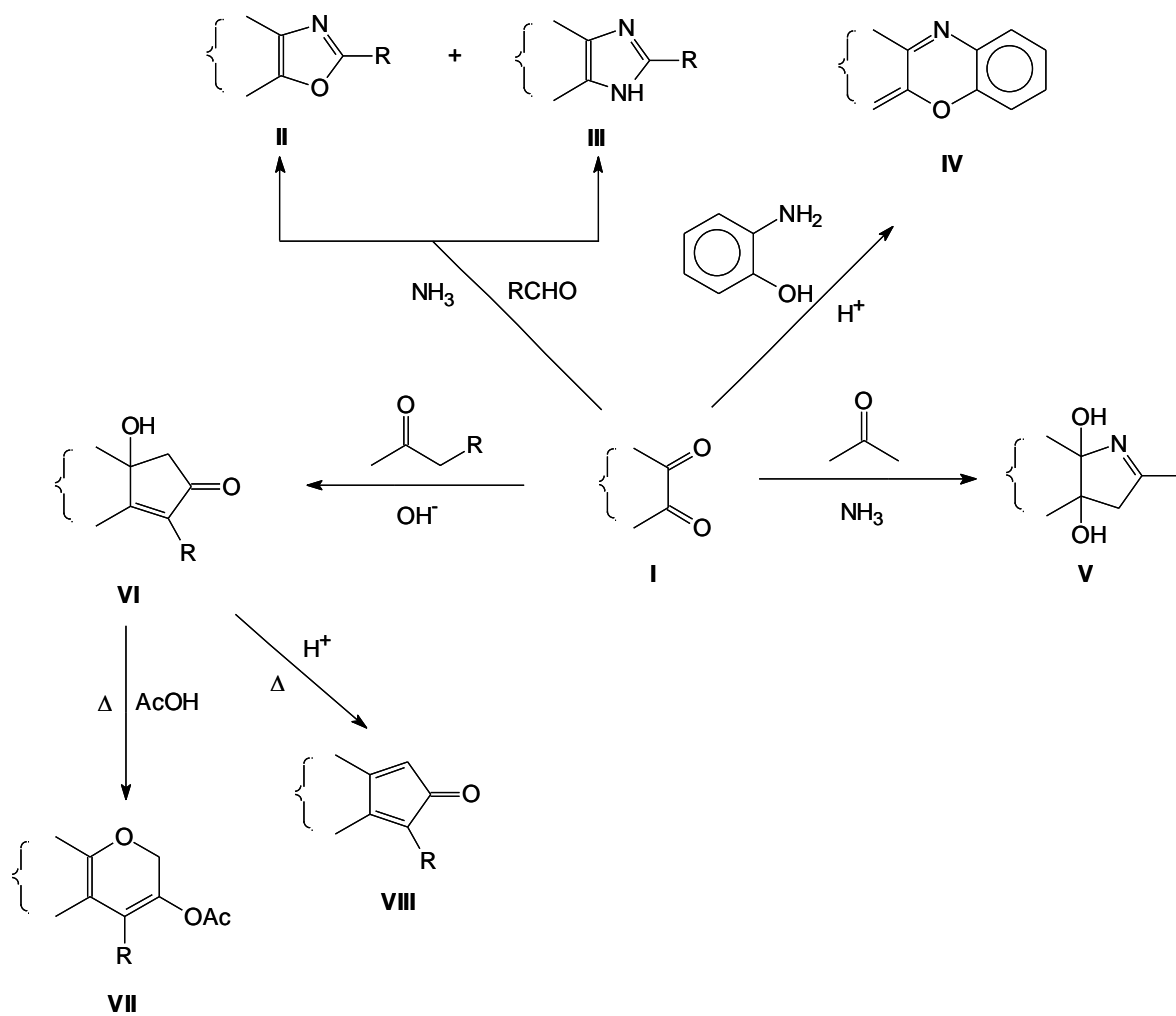
Scheme 4. Naphthoimidazoles assayed and their trypanocidal activity. The numbers in parentheses correspond to the values of $IC_{50}/24$ h expressed in μ M, for the lytic effect on trypomastigotes of *T. cruzi*.

Scheme 5. Other heterocycles obtained from the naphthoquinones assayed and their trypanocidal activity. The numbers in parentheses correspond to the values of $IC_{50}/24$ h expressed in μ M, for the lytic effect on trypomastigotes of *T. cruzi*. nd = not determined.

Scheme 6. Naphthoimidazoles with pyridinyl and quinolyl rings (**22** and **23**), in which the nitrogen atom of the heterocyclic substituent are located three bonds-distant from its point of attachment to the pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazolic skeleton.

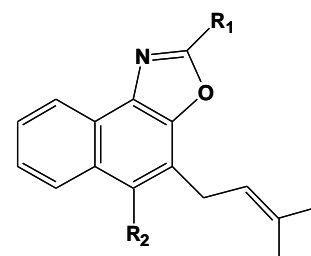
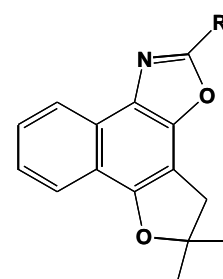
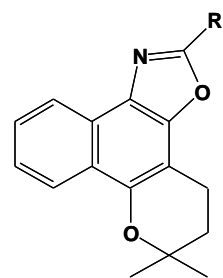
1	Lapachol	(410.8 ± 53.2)	
2	β-Lapachone	(391.5 ± 16.5)	
3	α-Lapachone	(> 4800)	
4	Nor-β-lapachone	(> 4800)	
5	Nor-lapachol	(1280.6 ± 167.2)	
6	Methoxy lapachol	(164.8 ± 30.5)	
7	R ₁ = Hydroxyl; R ₂ =H	(>2500)	
8	R ₁ = O-allyl; R ₂ =H	(420.7 ± 71.2)	
9	R ₁ = Hydroxyl; R ₂ = Allyl	(330.7 ± 62.4)	

Scheme 1



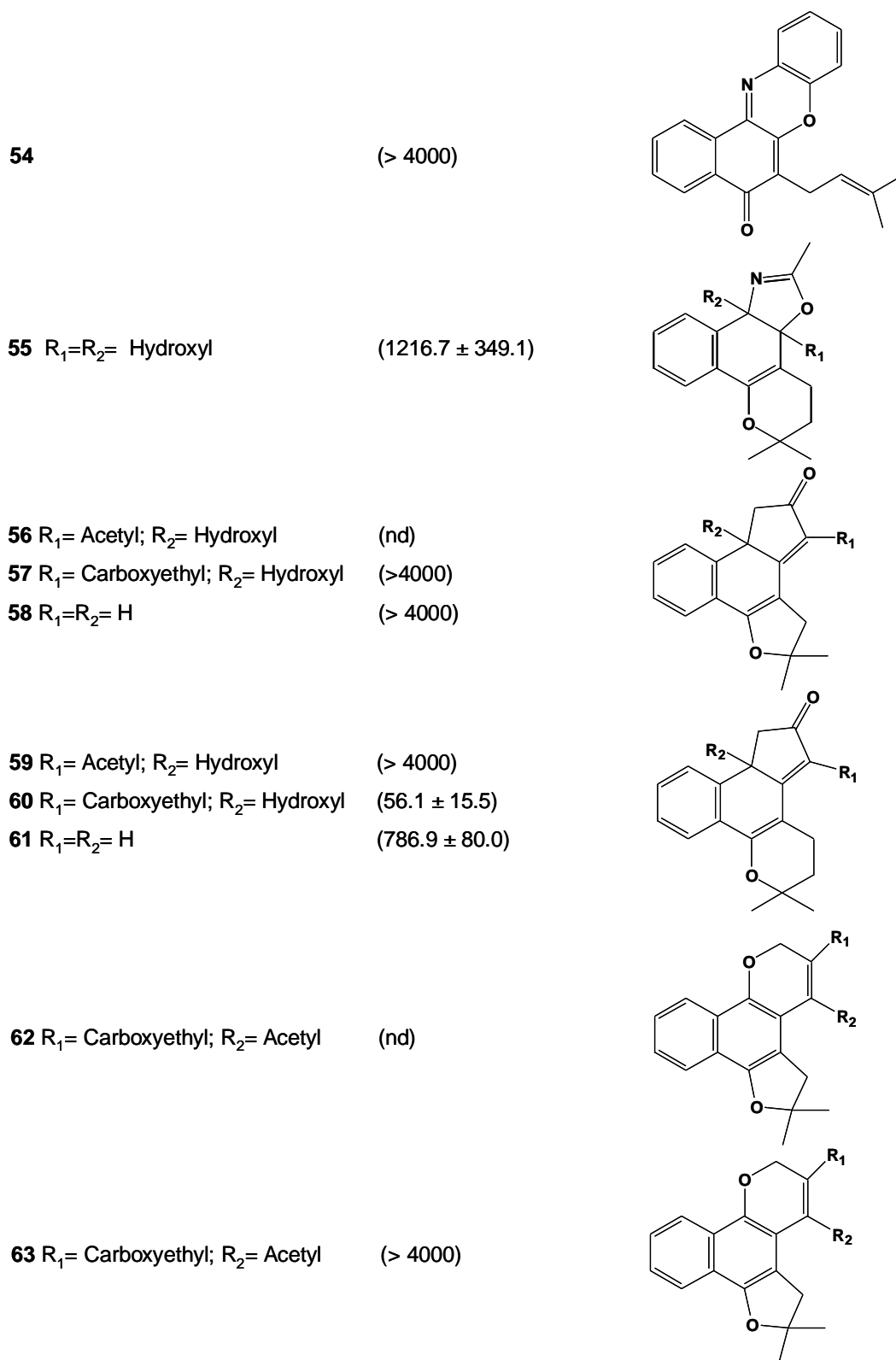
Scheme 2

10 R ₁ = H	(325.2 ± 21.3)
11 R ₁ = Phenyl	(283.5 ± 25.0)
12 R ₁ = 2-Hydroxyphenyl	(> 9600)
13 R ₁ = 4-Methoxyphenyl	(3502.5 ± 305.2)
14 R ₁ = 2-Acetylphenyl	(1641.3 ± 147.0)
15 R ₁ = 3,4-Methylenedioxyphenyl	(269.5 ± 46.5)
16 R ₁ = n-Propyl	(351.4 ± 12.4)
17 R ₁ = Ethyl formate	(> 4800)
18 R ₁ = H	(> 2500)
19 R ₁ = 2-Hydroxyphenyl	(> 2500)
20 R ₁ = H; R ₂ = OH	(> 2500)
21 R ₁ = H; R ₂ = OMe	(49.5 ± 1.4)
22 R ₁ = Phenyl; R ₂ = OH	(171.9 ± 51.2)
23 R ₁ = Phenyl; R ₂ = OMe	(197.3 ± 25.8)

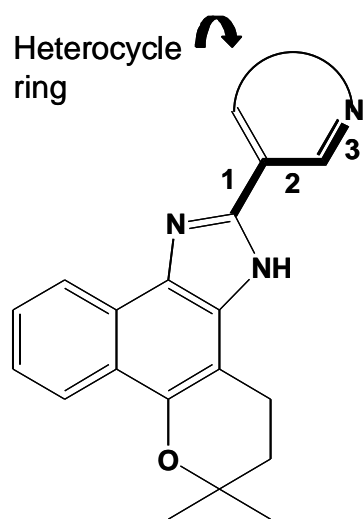


Scheme 3

clxxx



Scheme 5



Scheme 6

10. ÍNDICE REMISSIVO

A

aclarubicina		15
.....		
ácido	desoxirribonucléico;	DNA 2, 7, 14, 15, 16, 19, 20, 64, 65, 66, 70, 72
.....		
ácido		nalidíxico 16
.....		
ácido	ribonucléico;	RNA 7, 15
.....		
acidocalcisomo		ix, 8, 9, 64, 68
.....		
acridina,	laranja	de; LA 67, 68, 72
.....		
alcalóides		16
.....		
alfavaca (<i>Ocimum gratissimum</i>), óleo essencial de		66
.....		
alil- β -lapachona		21
.....		
alopurinol		14, 65
.....		
amino	difenilsulfetos,	2 16
.....		
análises ultra-estruturais		ix, 5, 8, 20, 64, 65, 68, 69
.....		
anfotericina		B 65
.....		

B

barbeiro		3, 9
.....		
basal,		corpúsculo 6, 7
.....		
benznidazol		12, 13, 14, 70
.....		
bignoniaceae		17, 18
.....		
<i>Biomphalaria</i>		sp. 19
.....		
biossíntese	de	isoprenóides 22
.....		
<i>Blastocrithidia</i>		sp. 16, 66
.....		

“blebs”	de	membrana	ix, 20, 64, 69, 72
.....			
bolsa		flagelar	6, 7, 67, 68
.....			
<i>brucei, Trypanosoma; T. brucei</i>			15, 66
.....			
butionina sulfoximina			14
.....			
C			
camptotecina			16, 66
.....			
Carlos		Chagas	2
.....			
cetoconazol			14
.....			
Chagas,		Carlos	2
.....			
Chagas,	doença	de	2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 70
.....			
ciclo	redox	(reação)	17, 20, 21, 70
.....			
cinetoplasto			7, 8, 16, 20, 65, 66, 68
.....			
cinetoplasto,	DNA	do;	kDNA ix, 7, 16, 20, 64, 65, 66, 70
.....			
cisteína		proteínases	8, 15, 69
.....			
citometria de fluxo			ix, 26, 65, 67, 72
.....			
citóstoma			7, 67
.....			
compartimento pré-lisosomal; reservosomo			ix, 7, 8, 64, 67, 68, 70, 72
.....			
complexo de Golgi; “Trans Golgi Network”			ix, 7, 8, 64, 68, 69, 70, 72
.....			
complexos de platina			16
.....			
corpúsculo basal			6, 7
.....			
crystal violeta; violeta de genciana			11, 62
.....			
<i>Crithidia sp.</i>			16, 20, 66
.....			
cromatina de DNA			ix, 21, 64, 66, 70, 72
.....			

<i>cruzi, Trypanosoma; T. cruzi</i>	ix, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 22, 24, 26, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72
cruzipaína	8, 69
D	
daunorrubicina	17
derivados de poliaminas	16
derivados fenazínicos; fenazinas	ix, 22, 24
derivados fenoxazólicos; fenoxazóis	ix, 22, 24
derivados heterocíclicos	22, 62
derivados naftoimidazólicos; naftoimidazóis	ix, 22, 23, 24, 26, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72
derivados oxazólicos; oxazóis	ix, 22, 24
desoxirribonucléico, ácido;	DNA 2, 7, 14, 15, 16, 19, 20, 64, 65, 66, 70, 72
DNA	2, 7, 14, 15, 16, 19, 20, 64, 65, 66, 70, 72
DNA, cromatina de	ix, 21, 64, 66, 70, 72
DNA do cinetoplasto; kDNA	ix, 7, 16, 20, 64, 65, 66, 70
DNA topoisomerasas	14, 15, 16, 19, 66
doença de Chagas	2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 70
doxorrubicina	15, 17
DT-diaforase	17, 62
E	
eletrônica, microscopia	26, 64, 67, 68
endocitose; via endocítica	ix, 7, 67, 68
endoplasmático, retículo	ix, 7, 64, 69

etoposídeo	16, 66
F	
fenazínicos, derivados; fenazinas	ix, 22, 24
fenoxazólicos, derivados; fenoxazóis	ix, 22, 24
flagelar, bolsa	6, 7, 67, 68
flagelo	5, 6, 64
fluconazol	14, 15
fluorescência, microscopia de	26, 67
fluxo, citometria de	ix, 26, 65, 67, 72
G	
genciana, violeta de; cristal violeta	11, 62
glicosomo	8
glutaciona	14, 16
glutaciona redutase	16
Golgi, complexo de; “Trans Golgi Network”	ix, 7, 8, 64, 68, 69, 70, 72
H	
heterocíclicos, derivados	22, 62
HIV	15, 19
hidroquinona	17
I	
IC₅₀	ix, 15, 24, 62, 63, 65, 66, 68
iodeto de propídio	65
ipê; <i>Tabebuia sp.</i>	17, 18
isoprenóides, biossíntese de	22

itraconazol

14

K

kDNA; DNA do cinetoplasto ix, 7, 16, 20, 64, 65, 66, 70

L

lapachol 17, 18, 19, 21, 24

lapachona, α - 17, 18, 24

lapachona, β - ix, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 62, 64, 65, 66, 69, 70

laranja de acridina; LA 67, 68, 72

Leishmania sp. 16, 22, 65, 66, 69

licochalcona 66

livres, radicais 11, 16, 20, 21, 69

M

membrana, “blebs” de ix, 20, 64, 69, 72

metaciclologênese 7, 16, 68, 72

microscopia eletrônica 26, 64, 67, 68

microscopia de fluorescência 26, 67

microtúbulos subpeliculares 6, 7, 20, 69

mitocôndria ix, 6, 8, 11, 20, 64, 65, 66, 68, 70, 72

mitomicina 17

mitoxantrona 15

N

N1 ix, 22, 23, 24, 26, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72

N2 ix, 22, 23, 24, 26, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72

N3 ix, 22, 23, 24, 26, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72

naftofurandiona	21
naftoimidazóis; naftoimidazólicos, derivados	ix, 22, 23, 24, 26, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72
naftoquinonas	ix, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 62, 69
nalidíxico, ácido	16
nerolidol	22
nifurtimox	12, 13, 14
novobiocina	16, 66
núcleo	6, 8, 15, 66, 68
O	
<i>Ocimum gratissimum</i> (alfavaca), óleo essencial de	66
ofloxacina	66
ovotiol	14
oxazólicos, derivados; oxazóis	ix, 22, 24
P	
<i>Panstrongylus sp.</i>	3
paramomicina	65
pentamidina	65
<i>Plasmodium sp.</i>	8, 19
platina, complexos de	16
poliaminas, derivados de	16
pré-lisosomal, compartimento; reservosomo	ix, 7, 8, 64, 67, 68, 70, 72
propídio, iodeto de	65
proteínases, cisteína	8, 15, 69

Q

quinacrina	16
.....	
quinolinfurandiona	21
.....	
quinonas	ix, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 24
.....	

R

radicais livres	11, 16, 20, 21, 69
.....	
redox, ciclo (reação)	17, 20, 21, 70
.....	
redutase, glutationa	16
.....	
redutase, tripanotona	15, 16
.....	
redutase, succinato citocromo c	ix, 66, 72
.....	
reservosomo; compartimento pré-lisosomal	ix, 7, 8, 64, 67, 68, 70, 72
.....	
retículo endoplasmático	ix, 7, 64, 69
.....	
<i>Rhodnius sp.</i>	3
.....	
ribonucléico, ácido; RNA	7, 15
.....	
RNA	7, 15
.....	
rodamina 123; R-123	65, 72
.....	
Romaña, sinal de	2
.....	
S	
<i>Schistosoma sp.</i>	19
.....	
semiquinonas	16, 17, 20
.....	
sesquiterpeno	22
.....	
sinal de Romaña	2
.....	
subpeliculares, microtúbulos	6, 7, 20, 69
.....	

succinato citocromo c redutase	ix, 66, 72
sulfoximina, butionina	14
T	
<i>Tabebuia</i> sp.; ipê	17, 18
topoisomerasas, DNA	14, 15, 16, 19, 66
“Trans Golgi Network”; complexo de Golgi	ix, 7, 8, 64, 68, 69, 70, 72
triatominae	3, 12
<i>Triatoma</i> sp.	3
<i>Trypanosoma brucei</i>; <i>T. brucei</i>	15, 66
<i>Trypanosoma cruzi</i>; <i>T. cruzi</i>	ix, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 22, 24, 26, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72
tripanosomatídeos	6, 7, 8, 15, 16, 20, 21, 66, 67, 69
tripanotiona	14, 16
tripanotiona redutase	15, 16
U	
ultra-estruturais, análises	ix, 5, 8, 20, 64, 65, 68, 69
V	
verbenaceae	18
via endocítica; endocitose	ix, 7, 67, 68
violeta, cristal; violeta de genciana	11, 62