

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Caracterização de potenciais alvos moleculares e teste
de fármacos candidatos ao tratamento da doença de
Chagas experimental

por

Marcela Lencine Ferraz

Belo Horizonte
Setembro/2009

TESE DBCM – CPqRR

M.L. FERRAZ

2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES E TESTE DE
FÁRMACOS CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL**

por

Marcela Lencine Ferraz

Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutora em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular.
Orientador: Alvaro José Romanha

Belo Horizonte
Setembro/2009.

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F831p
2009

Ferraz, Marcela Lencine.

Caracterização de potenciais alvos moleculares e teste de fármacos candidatos ao tratamento da doença de Chagas experimental / Marcela Lencine Ferraz. – Belo Horizonte, 2009.

xviii, 157 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 155 - 175

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Doença de Chagas/quimioterapia 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. *Trypanosoma cruzi*/genética 4. Mecanismos moleculares de ação farmacológica I. Título. II. Romanha, Álvaro José (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES E TESTE DE
FÁRMACOS CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL**

por

Marcela Lencine Ferraz

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Alvaro José Romanha (Presidente)

Dra. Maria Terezinha Bahia

Dra. Maria Nazaré Socira

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Dr. Fabiano Sviatopolk Mirsky Pais

Suplente: Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Tese defendida e aprovada em 25/09/2009

Agradecimentos

Mais uma etapa está sendo cumprida... E é chegada a hora dos agradecimentos:

Primeiramente, agradeço ao meu orientador Dr. Alvaro Romanha. Foram muitos anos de convívio, de muitas oportunidades e aprendizado. Foi muito importante para minha formação contar com uma pessoa tão competente no que faz, mas mais do que isso foi fundamental contar com o seu apoio e conselhos durante todo esse período. Minha admiração e gratidão serão eternas;

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, através do Programa de Pós Graduação, pelas oportunidades e especialmente pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também a equipe de técnicos do Biotério, por todo o suporte nos experimentos *in vivo*;

A Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma;

A minha querida amiga Rosana Alves, que me auxiliou incansavelmente desde o mestrado nas atividades de quimioterapia experimental, estando sempre presente em momentos cruciais;

A Dra. Silvane Murta, que me acolheu em sua linha de pesquisa, possibilitando que eu ampliasse meus horizontes e adentrasse no “mundo” da biologia molecular;

Aos colegas do LPCM. É impossível citar nominalmente todos... Nesses mais de seis anos, vi muitas pessoas entrarem e também pessoas queridas saírem do laboratório. Mas o saldo desse período foi muito positivo porque as lembranças do convívio, carinho e as amizades permanecerão para sempre. Em especial, agradeço a minha amiga Fernanda Barbosa, grande companheira desde que cheguei no René Rachou;

A nossa querida Maureen Rodarte, um anjo disfarçado de secretária, que sempre estive lá quando precisei, não só para o trabalho, mas para vida. A Carol e a Michele, que muito me ajudaram e que muitas vezes ouviram meus lamentos na ante-sala do chefe; E também a Andréa e Cristiane, secretárias da Pós-graduação pelo auxílio sempre que necessário;

Aos colegas da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, minha nova casa, pelo convívio e pela confiança que depositam no meu trabalho;

A minha amiga/irmã Fernanda Freire. Essa é uma das grandes bênçãos que o René Rachou trouxe para a minha vida. Agradeço a amizade, companheirismo e por todos os ensinamentos na área de biologia molecular;

Minha família, minha vida. Com toda a distância, nunca faltou apoio e amor que foram fundamentais para que eu prosseguisse. Em especial minha mãe Cildete, que lutou bravamente para que eu chegasse até aqui;

Ao meu marido André (Nuni!) por estar sempre ao meu lado, acalmando minhas angústias e me transmitindo o mais sincero amor, mesmo diante das minhas ausências;

Enfim, como dizem “Não é a tese que acaba, é o tempo que termina”. E o meu tempo acabou. Agradeço a todos que de maneira geral contribuíram e participaram dessa importante fase da minha vida. Mais do que o título, levo do René Rachou uma grande experiência de vida, que fez de mim uma pessoa melhor. Tenho orgulho de ser Fiocruz.

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1 Introdução.....	19
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> : características gerais, ciclo biológico, formas de transmissão e controle	20
1.2 A doença de Chagas: importância e formas clínicas	22
1.3 Resposta imune do hospedeiro na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.4 Quimioterapia da doença de Chagas: o Benzonidazol	26
1.5 Evidências experimentais e clínicas da cooperação do sistema imune na eficácia do tratamento da doença de Chagas	27
1.6 Novas alternativas para a quimioterapia da doença de Chagas	30
1.7 Busca de novos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas	31
1.8 Tiol transferase (Tc52)	32
1.9 Glutamato desidrogenase (<i>TcGluDH</i>).....	35
1.10 Aldo/Ceto redutase (<i>TcAKR</i>).....	37
1.11 Posaconazol	38
1.12 Ravuconazol.....	40
1.13 Amiodarona.....	41
1.14 Tamoxifeno.....	42
2 Justificativa.....	44
3 Objetivos.....	47
3.1 Objetivo geral.....	48
3.2 Objetivos específicos.....	48

4 Material e Métodos.....	49
A) Caracterização de alvos moleculares para quimioterapia.....	50
4.1 Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
4.2 Manipulação de DNA e RNA	50
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	52
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	52
4.5 Purificação do produto de PCR.....	52
4.6 RT-PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR).....	54
4.7 Northern Blot	55
4.8 Southern Blot.....	55
4.9 Eletroforese de pulso alternado (PFGE).....	55
4.10 Marcação de sondas com ³² P e ensaios de hibridização.....	56
4.11 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes.....	57
4.12 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	59
4.13 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes.....	59
4.14 Purificação das proteínas recombinantes.....	60
4.15 Confirmação da identidade da proteína Tc52 recombinante.....	61
4.16 Dosagem de proteínas	62
4.17 Obtenção de anticorpos policlonais.....	62
4.18 Extração de proteínas totais do <i>T. cruzi</i>	62
4.19 Western Blot.....	63
4.20 Análise densitométrica das imagens.....	63
B) Caracterização de inibidores para o tratamento da doença de Chagas.....	64
4.21 Cepas de <i>T. cruzi</i>	64
4.22 Estudos da atividade anti- <i>T. cruzi</i> <i>in vitro</i>	64
4.22.1 Teste contra formas epimastigotas.....	64
4.22.2 Ensaio colorimétrico de suscetibilidade a fármacos medido pelo Alamar Blue.....	65
4.23 Teste <i>in vivo</i>	65
4.23.1 Animais.....	65
4.23.2 Infecção.....	66
4.23.3 Parasitemia.....	66
4.23.4 Sobrevivência.....	66

4.23.5 Fármacos	66
4.23.6 Tratamento.....	67
4.23.7 Hemocultura.....	68
4.23.8 Reação em cadeia de polimerase	70
4.23.9 Análise estatística.....	71
5 Resultados.....	72
A) Caracterização de potenciais alvos moleculares.....	73
5.1 Tiol transferase (<i>Tc52</i>).....	73
5.1.1 Organização genômica do gene <i>Tc52</i> analisado através de Southern Blot.....	73
5.1.2 Nível de mRNA do gene <i>Tc52</i> em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.....	74
5.1.3 Clonagem e expressão da proteína Tiol transferase recombinante.....	76
5.1.4 Confirmação da identidade da proteína r <i>Tc52</i>	78
5.1.5 Teste de solubilidade e purificação da proteína r <i>Tc52</i>	78
5.1.6 Avaliação do nível de expressão da proteína <i>Tc52</i>	79
5.2 Glutamato desidrogenase (<i>TcGluDH</i>).....	80
5.2.1 Organização do gene <i>TcGluDH</i> analisado através de Southern Blot.....	80
5.2.2 Nível de mRNA do gene <i>TcGluDH</i> em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.....	82
5.2.3 Localização do gene <i>TcGluDH</i> nos cromossomos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
5.2.4 Clonagem e expressão da proteína recombinante Glutamato desidrogenase (r <i>TcGluDH</i>).....	85
5.2.5 Teste de solubilidade e purificação da proteína r <i>TcGluDH</i>	86
5.2.6 Nível de expressão da proteína r <i>TcGluDH</i> em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.....	87
5.3 Aldo/Ceto redutase.....	88
5.3.1 Organização genômica do gene <i>TcAKR</i> analisado através de <i>Southern Blot</i> ..	88
5.3.2 Nível de mRNA do gene <i>TcAKR</i> em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.....	90
5.3.3 Localização do gene <i>TcAKR</i> nos cromossomos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
5.3.4 Clonagem e expressão da <i>TcAKR</i>	92
B) Caracterização da atividade de fármacos candidatos ao tratamento da doença	

de Chagas.....	93
5.4 Caracterização da atividade tripanosomicida de fármacos disponíveis comercialmente para outros fins.....	93
5.4.1 Tamoxifeno – avaliação da atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	93
5.4.2 Amiodarona – avaliação da atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	101
5.5 Associação de fármacos para o tratamento da doença de Chagas	102
5.5.1 Amiodarona e Benzonidazol	102
5.5.2 Amiodarona e Ravuconazol	106
5.6 Teste de fármacos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas	110
C) Efeito cooperativo do sistema imune na eficácia do tratamento da doença de Chagas	111
5.7 Avaliação da cooperação dos linfócitos na atividade dos IBEs.....	111
5.7.1 Posaconazol	111
5.8 Avaliação do papel do interferon gama na atividade dos inibidores da biossíntese de ergosterol	117
5.8.1 Ravuconazol.....	117
6 Discussão	119
7 Conclusões	133
8 Anexos	135
8.1 Artigo publicado	136
8.2 Artigo submetido	142
9 Referências bibliográficas.....	155

Lista de Figuras

Figura 1 -	Ciclo biológico da doença de Chagas. Modificado de www.who.int	22
Figura 2 -	Estrutura química do Benzonidazol	27
Figura 3 -	Reação catalizada pela enzima Tiol transferase	34
Figura 4 -	Representação esquemática da atividade da <i>TcGluDH-NADP+</i>	36
Figura 5 -	Representação esquemática da atividade catalisada pela Aldo/Ceto redutase	37
Figura 6 -	Estrutura química do Posaconazol	39
Figura 7 -	Representação estrutural do inibidor da biossíntese de ergosterol Ravuconazol	40
Figura 8 -	Estrutura química da Amiodarona	41
Figura 9 -	Estrutura química do Tamoxifeno	43
Figura 10 -	Representação esquemática do plasmídeo de expressão pQE-31, utilizado para clonagem e expressão das proteínas recombinantes ..	58
Figura 11 -	Representação esquemática dos sítios de restrição das enzimas <i>KpnI</i> e <i>BamHI</i> , no gene <i>Tc52</i> conforme demonstrado pelo programa GeneTool Lite®.....	73
Figura 12 -	Organização genômica do gene <i>Tc52</i> em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis (17WTS e BZS) e resistentes (17LER e BZR) ao Benzonidazol.....	74
Figura 13 -	Nível de mRNA do gene <i>Tc52</i> em cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.....	75
Figura 14 -	Nível de expressão do mRNA do gene <i>Tc52</i> de <i>T. cruzi</i> por PCR em tempo real (qPCR)	76
Figura 15 -	Confirmação da clonagem do gene <i>Tc52</i> em bactérias <i>Escherichia coli</i>	77
Figura 16 -	Expressão da proteína rTc52	77
Figura 17 -	Sequência de aminoácidos da proteína Tc52 identificada por espectrometria de massa MALDI-ToF.....	78
Figura 18 -	Nível de expressão da proteína Tc52	79
Figura 19 -	Representação esquemática dos sítios de restrição das enzimas	

	<i>AvaI</i> e <i>EcoRI</i> , no gene <i>Tc52</i> conforme demonstrado pelo programa GeneTool Lite®.....	80
Figura 20 -	Organização genômica do gene <i>TcGluDH</i> em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.....	81
Figura 21 -	Nível de mRNA do gene <i>TcGluDH</i> em cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ	83
Figura 22 -	Localização cromossômica do gene <i>TcGluDH</i> em cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ	84
Figura 23 -	Confirmação da clonagem do gene <i>TcGluDH</i> em bactérias <i>Escherichia coli</i>	85
Figura 24 -	Indução da expressão da proteína recombinante <i>TcGluDH</i> com IPTG em bactérias <i>E. coli</i> M-15	86
Figura 25 -	Solubilidade da proteína r <i>TcGluDH</i>	86
Figura 26 -	Purificação da proteína <i>TcGluDH</i>	87
Figura 27 -	Nível de expressão da proteína <i>TcGluDH</i>	88
Figura 28 -	Representação esquemática dos sítios de restrição da enzima <i>KpnI</i> , no gene <i>TcAKR</i> conforme demonstrado pelo programa GeneTool Lite®	89
Figura 29 -	Organização genômica do gene <i>TcAKR</i> em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol	89
Figura 30 -	Nível de mRNA do gene <i>TcAKR</i> em cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao Benzonidazol	90
Figura 31 -	Localização cromossômica do gene <i>TcAKR</i> em cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ	92
Figura 32 -	Clonagem e expressão da <i>TcAKR</i>	93
Figura 33 -	Atividade do Tamoxifeno e da Amiodarona em ensaios de atividade tripanosomicida <i>in vitro</i> contra formas tripomastigotas da cepa BZR de cultura de células	95
Figura 34 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com Tamoxifeno – 10mg, Benzonidazol e não tratados.....	97
Figura 35 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e	

	tratados com Tamoxifeno – 25mg, Benzonidazol e não tratados	98
Figura 36 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com Tamoxifeno – 50mg, Benzonidazol e não tratados	99
Figura 37 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos machos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados Tamoxifeno – 50mg, Benzonidazol e não tratados .	100
Figura 38 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados Amiodarona, Benzonidazol e não tratados	104
Figura 39 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com a associação Amiodarona e Benzonidazol – 100, 50 e 25mg/Kg/dia (associação), Benzonidazol e não tratados	105
Figura 40 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos Swiss-Webster infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benzonidazol e não tratados.....	107
Figura 41 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol e Amiodarona (associação), Benzonidazol e não tratados.....	108
Figura 42 -	Parasitemia dos camundongos C57BL/6 (A), LTCD4 ⁺ KO (B), LTCD8 ⁺ KO (C) e LBKO (D) infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com Posaconazol ou Benzonidazol e não tratados	114
Figura 43 -	Sobrevivência dos camundongos C57BL/6 (A), LTCD4 ⁺ KO (B), LTCD8 ⁺ KO (C) e LBKO (D) infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com Posaconazol ou Benzonidazol e não tratados	115
Figura 44 -	Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos IFN- γ KO infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benzonidazol e não tratados.....	118

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas nos ensaios de caracterização de alvos moleculares para quimioterapia	51
Tabela 2 - Iniciadores específicos utilizados para amplificação dos genes de <i>T. cruzi</i> incluídos neste estudo	53
Tabela 3 - Esquema de tratamento dos camundongos tratados na fase aguda da doença de Chagas experimental.....	69
Tabela 4 - Esquema de tratamento dos camundongos tratados na fase crônica da doença de Chagas experimental.....	70
Tabela 5 - Diferenças no nível de mRNA do gene TcGluDH detectado por RT-PCR.....	84
Tabela 6 - Diferenças no nível de mRNA do gene TcAKR detectado por RT-PCR.....	91
Tabela 7 - Atividade <i>in vitro</i> do Tamoxifeno e do Benzonidazol sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	94
Tabela 8 - Atividade <i>in vitro</i> da Amiodarona e do Benzonidazol sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
Tabela 9 - Sobrevivência e cura parasitológica dos camundongos infectados com a cepa Y e submetidos a diferentes tratamentos durante a fase aguda da doença de Chagas	109
Tabela 10 - Sobrevivência e cura parasitológica dos camundongos infectados com a cepa Y e submetidos a diferentes tratamentos durante a fase crônica da doença de Chagas	111
Tabela 11 - Cura parasitológica e taxa de sobrevivência dos camundongos WT e LT CD4 ⁺ KO, LT CD8 ⁺ KO e LBKO, infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com Posaconazol e Benznidazol.....	116

Lista de Abreviaturas

³² P	Fósforo radioativo
AMIO	Amiodarona
BCIP	Substrato <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate</i>
BSA	Albumina bovina sérica
BZ	Benzonidazol
CDNA	DNA complementar
DDW	Água destilada e deionizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDI	<i>Drugs for Neglected Disease Initiative</i>
DNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
Dpi	Dias após a infecção
e.o.d	<i>Every other day</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GSH	Glutaciona
GSSH	Glutaciona dissulfeto
IBE	Inibidor da biossíntese de ergosterol
IC ₅₀	Concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitos
IFN- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil- β -D-galactopiranosideo
LB	Meio Luria-Bertani
LIT	Meio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NBT	Substrato <i>nitro-blue tetrazolium</i>
NFX	Nifurtimox
Ni-NTA	Resina de ácido nitrilotriacético com níquel
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulse field gel eletrophoresis</i> (eletroforese de campo alternado)
PGP	P-glicoproteína

R	Radical orgânico
RAVU	Ravuconazol
RNA	Ácido ribonucléico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase acoplada com a transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SSC	Tampão citrato de sódio
TAM	Tamoxifeno
TBE	Tampão tris-borato EDTA
Tc52	Tiol transferase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcADH	Álcool desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcAKR	Aldo/ceto redutase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcFeSOD-A	Ferro Superóxido dismutase A de <i>T. cruzi</i>
TcGluDH	Glutamato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcHGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferase de <i>T. cruzi</i>
TcHSP70	<i>Heat shock protein</i> de <i>T. cruzi</i>
TcOYE	<i>Old Yellow enzyme</i> de <i>T. cruzi</i>
TcTAT	Tirosina amino transferase de <i>T. cruzi</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde
Z1, Z2 e ZB	Zimodema

Resumo

No ano de comemoração do centenário de descoberta da doença de Chagas ainda são muitos os desafios e as dificuldades na busca de novas alternativas eficazes para o tratamento da doença. O objetivo deste trabalho foi caracterizar potenciais alvos moleculares e testar fármacos candidatos para o tratamento da doença de Chagas. Como alvos foram analisadas três enzimas: a Tiol Transferase (Tc52), a Glutamato Desidrogenase (TcGluDH) e a Aldo/ceto Redutase (TcAKR), selecionadas a partir de prévias análises de genômica e proteômica em cepas de *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. Como potenciais fármacos, foram escolhidos três medicamentos: o Tamoxifeno, a Amiodarona e o Ravuconazol, testados *in vitro* e *in vivo*, nas fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental. Para os testes *in vivo* os fármacos foram utilizados isoladamente ou em combinação. Adicionalmente, foi avaliado o efeito cooperativo do sistema imune na atividade dos inibidores da biossíntese de ergosterol, Posaconazol e Ravuconazol. Os resultados mostraram que apenas a TcGluDH foi diferencialmente expressa, apresentando uma menor expressão da proteína e do respectivo mRNA nas cepas resistentes ao Benzonidazol em comparação com as cepas sensíveis. Para TcAKR não foi possível completar a caracterização, mas observamos um aumento no nível de mRNA nas cepas resistentes analisadas quando comparada com as sensíveis. Não houve correlação entre a expressão da Tc52 e o fenótipo de resistência a fármacos do *T. cruzi*. Nos testes de fármacos, as melhores resultados foram obtidos com a associação Ravuconazol e Amiodarona: 60% de cura e 90% de sobrevivência dos camundongos infectados e tratados nas fases aguda e crônica. A associação entre Amiodarona e Benzonidazol não gerou efeito sinérgico ou aditivo na cura da doença de Chagas experimental. O Tamoxifeno apesar de ter se mostrado potente nos testes *in vitro* foi inativo *in vivo*. Com relação a avaliação da cooperação do sistema imune na atividade do Posaconazol, nossos resultados mostraram uma nítida influência dos diferentes tipos de linfócitos na atividade desse fármaco assim como para o Benzonidazol. Provavelmente, esse efeito foi devido a ação preferencial desses fármacos sobre diferentes estágios do parasito, em cooperação com diferentes elementos do sistema imune. A utilização de camundongos knockout mostrou que a ausência de Interferon- γ reduziu a atividade do Ravuconazol e Benzonidazol. O presente trabalho abre perspectivas para serem exploradas.

Abstract

In the year of commemoration of the centenary of Chagas disease discovery, the challenges and difficulties in the search of new efficient alternatives for the treatment of the illness still remain. The objectives of this work were to characterize potential molecular targets and test drugs candidates for the treatment of the Chagas disease. Three potential targets had been selected: Thiol Transferase (Tc52), Glutamate Dehydrogenase (TcGluDH) and the Aldo/Keto Reductase (TcAKR). They were pointed out by genomic and proteomic analysis of Benznidazole susceptible and resistant *Trypanosoma cruzi* strains. As potential drugs, three medicines had been chosen: Tamoxifen (TAM), Amiodarone (AMIO) and Ravuconazole (RAVU). They were tested *in vitro* and *in vivo*, in the acute and chronic phases of the experimental Chagas disease. For the tests *in vivo* the drugs had been used separately or in combination. Additionally, we evaluate the cooperative effect of the host immune system in the activity of inhibitors of the biosynthesis of ergosterol, Posaconazole (POS) and RAVU. The results show that only the TcGluDH was differentially expressed, presenting a reduction in the protein expression and mRNA levels in resistant strains to Benznidazole. Although a complete characterization of TcAKR could not be reached, we observe difference in the mRNA levels in the strains analyzed. However no correlation between the expression of the Tc52 and resistance phenotype was observed. In the tests of drugs, the highest activities were observed for RAVU and AMIO association: 60% of cure and 90% of survival of the infected and treated mice in the chronic phase. The association between AMIO and BZ generate neither synergic or additive effect in the cure of the experimental Chagas disease. Although TAM presented high activity *in vitro* it was inactive *in vivo*. In regard to cooperation effect of the host immune system a clear influence of the lymphocytes were observed on the activity of POS and BZ. Our results show that the absence of different lymphocytes activities has distinct effects on the efficacy of POS and BZ in the treatment of murine acute *T. cruzi* infection. Probably, this effect had the preferred stock of these drugs on different parasite stages, in cooperation with different elements of the immune system. The use of knockout mice showed that the absence of gamma interferon reduced the RAVU and BZ activities. The present work considers new alternatives for the Chagas disease chemotherapy, and opens perspectives to be further explored.

1 Introdução

1.1 O *Trypanosoma cruzi*: características gerais, ciclo biológico, formas de transmissão e controle

O *T. cruzi* é um parasito digenético que apresenta um genoma com cerca de $1-2 \times 10^8$ pares de base, e uma organização do material genético que difere em parte dos outros eucariotos tais como *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* sp. Aproximadamente 50% do seu material genético é formado por seqüências repetitivas, presentes em múltiplas cópias e que são arranjadas em tandem (Castro et al., 1981; Ullu & Nielsen, 1995; El-Sayed et al., 2005).

O processamento do mRNA é outra importante característica dos tripanosomatídeos que transcrevem longos mRNAs policistrônicos, que são processados antes da tradução (Nielsen, 1992). Durante esse processamento, ocorre a reação de “trans-splicing”, onde há a transferência de uma seqüência nucleotídica líder, conhecida como “splice leader” para a extremidade 5’ de cada mRNA maduro (Perry & Agabian 1991). A regulação da expressão gênica no *T. cruzi* ocorre principalmente no nível pós-transcricional através do processamento de transcritos primários (“trans-splicing” e poliadenilação), da estabilidade do mRNA e dos produtos da tradução (Vanhamme & Pays 1995; Teixeira 1998; Avila, et al. 2001).

Durante seu ciclo de vida (Figura 1), o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. Elas são caracterizadas quanto à posição do cinetoplasto (estrutura mitocondrial que contém DNA extra-nuclear) em relação ao núcleo, flagelo e forma. Os tripomastigotas, com 25 μm de comprimento, são caracterizados pela presença de um cinetoplasto localizado entre o núcleo e a porção posterior, um flagelo que atravessa toda a extensão do corpo do parasito e se externaliza com um pequeno segmento de membrana ondulante. Os amastigotas, com 4 μm de diâmetro são caracterizados pelo formato ovóide ou arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo interno. Os epimastigotas, com 20 a 40 μm de comprimento, têm forma de fuso, cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre bem desenvolvido. A forma tripomastigota é o estágio infectante, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e na porção final do aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota é o estágio intracelular do parasito no organismo do hospedeiro vertebrado, enquanto a forma epimastigota é o estágio não infectante, encontrada no hospedeiro invertebrado.

Além das diferenças morfológicas existentes entre os diferentes estágios evolutivos do parasito, há também uma variação genética, que produz um grande número de cepas com características individuais. As cepas conferem ao *T. cruzi* tipos de comportamentos distintos, como tropismo por diferentes órgãos ou diferença na virulência (Camargos et al., 2000). Tais características podem ser determinadas pela origem geográfica associada às características fisiológicas naturais do protozoário (Murta et al., 1998).

A forma de transmissão do parasito ao homem e a outros mamíferos, com maior importância epidemiológica, é através da penetração na pele lesada ou mucosa íntegra, das formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas nas fezes e/ou urina dos triatomíneos infectados, durante o repasto sanguíneo. Outras vias de transmissão observadas são através de transfusão sanguínea, transmissão congênita, transmissão por acidentes de laboratório e a transmissão oral (Dias, 2000). O transplante de órgãos é uma forma de transmissão que emerge como um problema importante, haja vista a condição de imunossupressão em que se encontra o transplantado, o que pode agravar o quadro da doença (Kun et al. 2009). Observa-se também, com o aumento do número de portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e com a utilização de medicamentos imunossupressores, a reativação de infecções crônicas em pacientes co-infectados pelo *T. cruzi*. Esses pacientes voltam a apresentar alta parasitemia, sinal clínico característico da fase aguda da doença (Diazgranados et al., 2009). Além disso, a transmissão oral tem merecido especial atenção devido a emergência de diversos surtos nas regiões norte e nordeste do Brasil (Pinto et al., 2008).

O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve o hospedeiro invertebrado, que se infecta através da ingestão de sangue contendo tripomastigotas. Essas formas passam por transformações no tubo digestivo dos triatomíneos e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) através da deposição de fezes contaminadas após a hematofagia. No organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas passam por novas transformações, formando amastigotas, que originam novos tripomastigotas que serão sugados pelo vetor, completando o ciclo (Figura 1). As principais espécies de vetores envolvidas na transmissão da doença de Chagas são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata* e *Triatoma brasiliensis*.

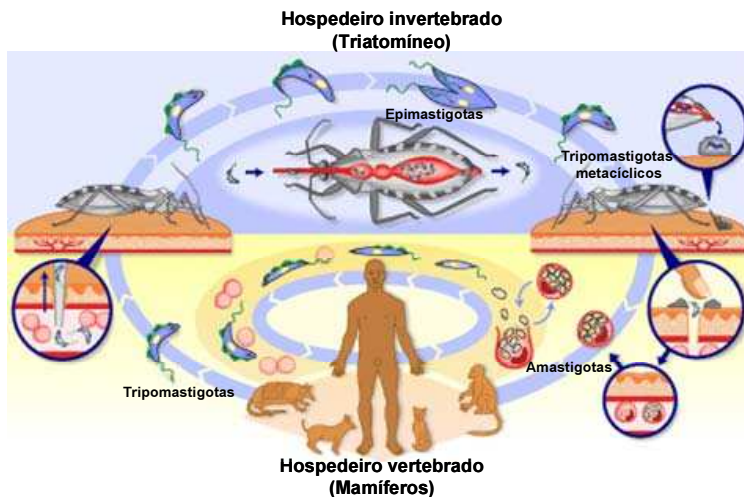


Figura 1 – Ciclo biológico da doença de Chagas. Modificado de www.who.int.

Após a infecção pelo *T. cruzi*, há a invasão de células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Porém, o *T. cruzi* têm tropismo preferencial por fagócitos mononucleares, células musculares, células adiposas e neurônios. Após a invasão, a patogênese da doença de Chagas pode ser classificada em fases aguda e crônica, de acordo com o tempo da infecção e características sorológicas.

1.2 A doença de Chagas: importância e formas clínicas

A fase aguda se prolonga por cerca de 30 a 90 dias, sendo geralmente caracterizada por um grande número de tripanosomas presentes na circulação (parasitemia patente). Em alguns casos, observam-se febre e manifestações clínicas nos locais de entrada como o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação. O comprometimento cardíaco nesta fase é frequente, podendo ocorrer miocardite, epicardite e endocardite aguda, assim como taquicardia. No sistema nervoso pode ser observada destruição neuronal intensa e nos órgãos do sistema digestivo podem ocorrer lesões discretas (Amato Neto et al., 1997, Ferreira et al., 2002).

A fase crônica é caracterizada pela parasitemia baixa e pelo elevado nível de anticorpos circulantes. As manifestações observadas nesta fase são decorrentes do curso intracelular do parasitismo. Ela pode ser dividida em diferentes formas clínicas,

denominadas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista ou neurológica (Ferreira et al., 2002). A forma indeterminada é caracterizada por altos níveis de Imunoglobulina G (IgG) e corresponde ao período sem manifestações clínicas evidentes, podendo haver comprometimento cardíaco e digestivo, porém discreto (Macêdo, 1997; Ferreira et al., 2002).

A fase crônica sintomática é classificada de acordo com o quadro clínico apresentado pelo chagásico. Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite inflamatória crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração (megacárdio). Essas alterações podem se manifestar através de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. A forma cardíaca é a principal responsável pela ocorrência de morte súbita, que é um fenômeno considerado como a principal causa de morte na doença de Chagas. (Rassi Jr. et al., 2001). Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e colon intestinal (megacolon), que causam problemas como disfagia, regurgitação e incoordenação motora (Rezende, 1997). A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitante. Na forma neurológica, observam-se alterações morfológicas no tecido nervoso central. Em pacientes chagásicos imunodeprimidos é comum o desenvolvimento de meningoencefalite e miocardite (Rocha et al., 1994).

A duração destas fases pode ser diferente entre os indivíduos, mas em geral o que se observa é um período de até 90 dias para a fase aguda, a vida toda para fase crônica indeterminada e um período muito variável para fase crônica sintomática, dependente da forma clínica e gravidade do quadro desenvolvido pelo paciente.

1.3 Resposta imune do hospedeiro na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se diretamente a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro contra o parasita (Brodskyn & Barral-Netto, 2000). Em cada fase da infecção, existe uma resposta imune específica com um repertório de células, citocinas e outras substâncias, que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo, mas que podem também estar envolvidos no desenvolvimento da patologia. Em consequência disto, têm sido realizados muitos trabalhos, principalmente experimentais, buscando a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro frente à infecção.

No início da infecção experimental são observados eventos desencadeados pela imunidade inata do hospedeiro, como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia regional, atrofia dos linfonodos mesentéricos e do timo (Ferreira et al., 2002). Essas alterações são acompanhadas pela ativação policlonal de linfócitos T e B, hipergamaglobulinemia, seguido por uma imunossupressão da resposta linfocitária e aumento da apoptose (revisto por Brener & Gazzinelli, 1997; DosReis, 1997). A resposta imune no princípio da infecção visa a redução e controle da replicação do parasito, além do preparo e otimização do sistema imune para gerar a resposta imune adquirida Th1 (revisto por Reis & Lopes, 2000).

Buscando a resolução da infecção, ocorre o processo inflamatório, através do recrutamento de células “Natural Killers” (NK), neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (revisto por Olivieri, 2004). Todas essas células possuem receptores, que com o auxílio do fator de necrose tumoral (TNF)- α ativam macrófagos para produzir citocinas (IL-1 e IL-6) e óxido nítrico (NO) (Gazzinelli et al., 1992; Brener & Gazzinelli, 1997). As células NK são capazes de produzir interferon- γ (IFN- γ) durante a fase aguda da doença, em resposta às formas tripomastigotas e independente das células T (Cardillo et al., 1996). Embora em menor intensidade, as células NK estão envolvidas na destruição das células infectadas quando há alteração no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) do tipo I. Porém, os macrófagos é que são as células fundamentais para o controle da replicação do parasito através da fagocitose, síntese de citocinas pró-inflamatórias e NO (Brener & Gazzinelli, 1997).

Estudos da resposta imune humoral demonstram que os anticorpos são instrumentos importantes de defesa do hospedeiro, durante a infecção. No início da infecção, o parasito induz uma resposta humoral polisotípica (principalmente IgM e IgG), com predominância de anticorpos que diferem em nível e atividade funcional (Bouhdid et al., 1994). A ativação policlonal dos linfócitos B é dependente de linfócitos T (LT) CD4⁺ (Minoprio et al., 1986) e contribui para uma redução da parasitemia e eliminação das formas sanguíneas. Cordeiro et al. (2001) observaram que os pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada apresentavam altos níveis de imunoglobulinas da classe IgG, em especial IgG1 e IgG3, sugerindo o envolvimento desses isotipos no controle da doença. Krettli & Brener (1982) demonstraram a existência de anticorpos protetores contra formas sanguíneas vivas de *T. cruzi*, denominados anticorpos líticos. Esses anticorpos induzem a lise dos parasitos mediada

por complemento e diferem dos anticorpos convencionais detectados nos diagnósticos sorológicos.

No entanto, a resposta celular é a mais importante no combate ao *T. cruzi* na fase inicial da doença, correspondendo a uma resposta sistêmica que protege contra a replicação de amastigotas intracelulares. O *T. cruzi* é um potente ativador da resposta Th1 (resposta celular), sendo capaz de estimular melhor a síntese de citocinas pró-inflamatórias do que os protozoários do gênero *Leishmania* sp. (Oliveira et al., 2000). A resposta celular é mediada nas fases aguda e crônica, principalmente pelos linfócitos T CD4⁺, que são responsáveis pela indução da imunidade protetora (Brener & Gazzinelli, 1997), ativando macrófagos, linfócitos T CD8⁺ através de citocinas. Além disso, os LT CD4⁺ são necessários para a produção dos anticorpos líticos.

Os LT CD8⁺ são um outro importante grupo de células, que estão envolvidos na produção de citocinas e na atividade citolítica, controlando a replicação *in vivo* do parasito e permitindo a resistência do hospedeiro (Brener & Gazzinelli, 1997). A contribuição desta célula é relevante, devido a habilidade apresentada pelo *T. cruzi* de infectar células não linfóides, onde é expresso apenas o MHC I, que é reconhecido pelos LT CD8⁺ (revisado por Reis & Lopes, 2000).

O MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) humano, é dividido em classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) e Classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Ambos são formados por duas cadeias polipeptídicas denominadas α e β . Em camundongos, os genes do MHC recebem outra nomenclatura: para o MHC de classe I são H-2K, H-2D e H-2L e para o MHC de Classe II são I-A e I-E. Tanto em humanos quanto em camundongos, os MHC de classe I e II têm uma importante função na regulação da resposta imune, ligando e apresentando os antígenos às células T (LT CD8⁺ e LT CD4⁺, respectivamente). Desse modo, acionam a seleção do repertório de células que atuarão na defesa do hospedeiro (Cruz-Robes e cols., 2004).

Na imunidade mediada por célula, os macrófagos atuam principalmente através da produção de óxido nítrico (NO), sendo um efector essencial no desenvolvimento da resposta Th1 contra *T. cruzi*, controlando a replicação através secreção de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-12) e aumento de substâncias co-estimulatórias (Brener & Gazzinelli, 1997).

Além das células efectoras, as citocinas são importantes mediadores que regulam a duração e a intensidade da resposta imune. São proteínas solúveis ou glicoproteínas produzidas por leucócitos e outros tipos celulares, que atuam como mediadores

químicos. Roggero et al. (2002) pesquisaram os fatores que influenciam no agravamento da doença de Chagas em linhagens de camundongos resistentes e suscetíveis à infecção. Os autores observaram que a disparidade na relação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias foi a variável associada com o aumento da morbidade. De fato, a resistência à infecção durante a fase aguda está diretamente relacionada à ativação de macrófagos mediada por citocinas (DosReis, 1997).

1.4 Quimioterapia da doença de Chagas: o Benzonidazol

O tratamento etiológico da doença de Chagas é uma questão ainda não completamente resolvida, apesar de passados 100 anos de descoberta da enfermidade. Esse ponto tem sido alvo de muitas pesquisas na busca de novos fármacos que sejam eficazes no combate ao *T. cruzi*, principalmente durante a fase crônica da doença de Chagas. Essa fase é o período em que a maioria dos pacientes é diagnosticada e onde o Benzonidazol, único medicamento disponível para o tratamento no Brasil, tem sua eficácia mais limitada (Cançado, 2002). Atualmente, o BZ é o único fármaco disponível para o tratamento no Brasil, uma vez que o Nifurtimox foi retirado do mercado devido a sua toxicidade. A cura pelo BZ depende da suscetibilidade das cepas de *T. cruzi*, estágio da doença e fisiologia do hospedeiro.

O BZ é um fármaco nitroheterocíclico (N-benzil-2-nitro-1imidazolacetamida, Figura 2) produzida anteriormente pela Roche, sob o nome de Rochagan®. Atualmente, a produção do BZ está sendo realizada no Brasil pelo laboratório farmacêutico central do estado de Pernambuco. O mecanismo de ação do BZ está relacionado à alteração de macromoléculas de forma covalente, através de intermediários nitroreduzidos, sem a geração de radicais livres (Urbina, 1999). Os efeitos colaterais mais comuns são dermatites por hipersensibilidade, anorexia, vômito, polineurite e depressão da medula óssea (Cançado, 2002).

A falha terapêutica de infecções crônicas em pacientes chagásicos tratados com nitroderivados tem sido constatada em diversos trabalhos (Urbina, 1999; Braga, et al., 2000). Além disso, o tratamento é pode ser ineficaz em casos de imunossupressão medicamentosa ou ainda para portadores da SIDA. Um grande obstáculo para obtenção da cura parasitológica é a grande variabilidade genética das populações de parasitos (Brenner & Chiari, 1967) e a existência de cepas naturalmente resistentes às fármacos (Murta et al., 1998), o que pode estar relacionado à origem geográfica das mesmas (Filardi & Brenner, 1987).

Cançado (1999) publicou uma avaliação do tratamento etiológico da doença de Chagas com BZ, em 21 pacientes tratados na fase aguda e examinados entre 13 a 21 anos depois do tratamento e 113 pacientes tratados na fase crônica, examinados entre 6 a 18 anos após o emprego da medicação. A partir das provas determinadas como critério de cura observou-se que o BZ foi eficaz no tratamento de 76% dos pacientes chagásicos tratados na fase aguda e apenas em 8% dos pacientes tratados na fase crônica, ficando evidente que a fase da doença influencia na eficácia terapêutica.

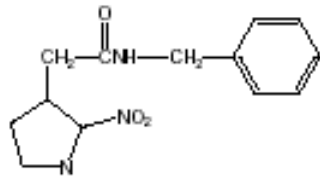


Figura 2 – Estrutura química do Benznidazol.

Além da baixa eficácia e dos efeitos colaterais, ainda existe o fenômeno de resistência natural do *T. cruzi* ao BZ e ao NFX. Filardi & Brener (1987) verificaram que algumas cepas de *T. cruzi* apresentavam resistência a fármacos, inclusive algumas provenientes do ambiente silvestre, sem prévio contato com pacientes tratados. Outro ponto importante é a comprovada dependência do BZ pelo sistema imune do hospedeiro. Hospedeiros com o sistema imune deficiente têm redução na eficácia do BZ (Romanha et al., 2002; Ferraz et al., 2007).

1.5 Evidências experimentais e clínicas da cooperação do sistema imune na eficácia do tratamento da doença de Chagas

De diferentes formas a quimioterapia e o sistema imune podem interagir durante o tratamento etiológico das infecções parasitárias. Essa interação pode ser através de uma ação sinérgica entre o fármaco e os componentes imunológicos do hospedeiro que leva à cura e induz proteção, assim como através da imunoterapia que potencia a eficácia do tratamento em alguns casos. Além disso, a quimioterapia pode induzir imunossupressão, alterando a resposta produzida pelo hospedeiro e agravando a doença (Targett, 1985).

Tais processos de interação entre o sistema imune e a eficácia do tratamento já foram demonstrados para algumas parasitoses como a malária, onde Taliaferro (1948)

observou que frangos esplenectomizados infectados com *Plasmodium gallinaceum* respondiam a quinina de maneira menos efetiva do que os frangos imunocompetentes. Mayxay et al. (2001) estudando a malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, observaram que pacientes submetidos ao tratamento e curados, apresentavam níveis séricos de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM superiores aos pacientes não curados, evidenciando o papel dos anticorpos na resposta terapêutica antimalárica.

O tratamento com pentamidina dimetilsulfonato, aumentou a resposta linfoproliferativa e os níveis séricos de anticorpos em cães portadores da leishmaniose visceral em relação aos cães que não receberam tratamento (Rhalem et al., 1999). Na esquistossomose, o Praziquantel foi menos efetivo em camundongos depletados de células T e infectados com *Schistosoma mansoni* do que em camundongos normais (Doenhoff et al., 1987). Ali e cols. (2003), verificaram que o tratamento de pacientes com microfilariose causada por *Onchocerca volvulus* com Ivermectina, foi seguido por um aumento na resposta imune que reduziu significativamente o efeito dermatológico da parasitose em portadores da forma atenuada da doença. Esse efeito não foi observado no grupo controle portador da forma severa.

Assim como em outras parasitoses, a doença de Chagas têm a resposta imunológica como um importante fator na resistência e controle da infecção pelo *T. cruzi*. Alguns trabalhos tem evidenciado a importância do sistema imune na eficácia do tratamento terapêutico. Índícios dessa ação cooperativa foram obtidos através de trabalhos realizados com o NFX. Lelchuk et al. (1977a,b) observaram que o tratamento com NFX pode suprimir a resposta imune mediada por célula. Meckert et al. (1988) constataram que camundongos chagásicos crônicos submetidos ao tratamento com NFX apresentam uma redução dos anticorpos anti-*T. cruzi* envolvidos na destruição dos parasitos. Essa redução causa uma perda na resistência a reinfeção com alto inóculo de parasito, pois altera a resposta imune humoral. Diferentemente, os animais chagásicos não-tratados controlaram melhor o nível de parasitemia, assim como os camundongos primo-inoculados.

O BZ tem sido alvo de diversas pesquisas experimentais e clínicas para avaliação da resposta imunológica durante a quimioterapia, visando identificar o grau de interação entre ambos e a interferência na cura. Lages-Silva et al. (1990) observaram que macrófagos de camundongos tratados com Megazol, NFX e BZ apresentaram maior fagocitose das formas sanguíneas de *T. cruzi*, quando comparados aos controles não-tratados. O parasito desaparecia da circulação sanguínea cerca de seis horas após a

administração de uma única dose do quimioterápico. Os autores sugeriram que a interação entre o fármaco e o sistema imune é fundamental para cura, podendo haver alterações da membrana de superfície do parasito após o tratamento, expondo moléculas reconhecidas pelo sistema imunológico.

Resultados semelhantes foram descritos por Murta e cols. (1999). Os autores verificaram um aumento significativo na fagocitose e destruição dos parasitos por macrófagos de camundongos incubados com tripomastigotas após 3 horas de tratamento com BZ. Também foi constatado um aumento nos níveis de IL-12, TNF- α e NO induzidos por IFN- γ . Porém, esse efeito foi observado apenas em animais infectados com cepas de *T. cruzi* sensíveis ao BZ, sugerindo que a interação do sistema imune com a eficácia terapêutica na doença de Chagas, depende também de características biológicas do parasito.

Piaggio e cols. (2001) analisaram o efeito imunológico do tratamento com BZ de ratos infectados pelo *T. cruzi*. Estes ratos foram submetidos a diferentes esquemas terapêuticos: dose curativa de BZ, IFN- γ recombinante, dose subótima de BZ e BZ + IFN- γ recombinante. Os grupos que receberam BZ tiveram redução de metabólitos derivados de NO, ao contrário do que ocorreu em ratos que receberam apenas IFN- γ recombinante. Além disso, os ratos que receberam apenas IFN- γ recombinante ou dose subótima de BZ, apresentaram aumento nos níveis de IL-1 β e IL-2, que estiveram reduzidos no grupo que recebeu BZ em conjunto com a imunoterapia com IFN- γ . Esses resultados evidenciam que há diferença no efeito imunomodulador de acordo com o protocolo de tratamento empregado.

Olivieri et al. (2002) ao realizarem tratamento de camundongos suíços infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, verificaram que o BZ induziu esplenomegalia no 9º dia de tratamento, seguida pelo aumento no número de células no baço e linfonodos. Esse efeito persistiu até o 14º dia e não foi observado em camundongos não tratados. A análise do fenótipo de linfócitos realizada no 14º dia, demonstrou que o BZ induz uma regulação baseada na expansão de LT CD8⁺ efetores e de memória, gerando uma concentração de LT que conferem resistência a um segundo desafio e reduzem a frequência da apoptose nos órgãos linfóides periféricos.

A utilização de rIL-12, em conjunto com o tratamento pelo BZ de camundongos infectados com a cepa resistente Colombiana, aumentou significativamente a taxa de cura de 13% para 69-100% (Michailowsky et al., 1998). Bahia-Oliveira e cols. (1998 e 2000) realizaram pesquisa clínica e imunológica de pacientes que haviam sido tratados

com nitrofuranos (NFX ou BZ) durante a fase aguda. Os pacientes curados apresentavam resposta imune proliferativa contra *T. cruzi* com níveis de IFN- γ maiores que os pacientes não-curados, podendo indicar a importância dessa citocina na cura da infecção humana.

Em estudo realizado no nosso laboratório, Romanha e cols. (2002) testaram a atividade das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12 e TNF- α da citocina anti-inflamatória IL-4 e da iNOS, na cura parasitológica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Para isso, utilizaram camundongos normais e knockouts infectados com a cepa Y e tratados com BZ. Os resultados mostraram cura de 100% nos camundongos selvagens e falha completa do tratamento em camundongos depletados de IFN- γ . Isso evidencia a influência do IFN- γ assim como da IL-12, na eficácia da quimioterapia com BZ. Em outro trabalho, foi mostrado a importância dessas mesmas citocinas na atividade do Posaconazol (Ferraz et al., 2007).

1.6 Novas alternativas para a quimioterapia da doença de Chagas

Desde o surgimento dos nitroderivados, muitas tentativas têm sido feitas, testando inúmeros fármacos e princípios ativos provenientes de produtos naturais na busca de atividade anti-*T. cruzi* (Brenner, 1984; de Castro, 1993; Coura & de Castro, 2002). As substâncias testadas são escolhidas através de estudos que identificam alvos metabólicos do parasito, ou novos compostos de forma empírica.

Atualmente, os alvos bioquímicos da quimioterapia experimental incluem a síntese de ergosterol, enzimas como a tripanotona redutase, cisteína protease, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerasas, dihidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase (Urbina, 1999; Coura & de Castro).

Entre os alvos citados, destacam-se os compostos ativos sobre a síntese de ergosterol, os chamados inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs), muito eficazes na depleção do ergosterol endógeno ou no acúmulo de intermediários tóxicos (Urbina et al., 1997). O ergosterol é um componente da membrana fundamental para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do *T. cruzi*, além de ser importante para sua proliferação *in vitro*. Por essa razão, é um alvo potencial para a pesquisa de quimioterápicos (Urbina, 1999). Diferentemente ao *T. cruzi*, as células do hospedeiro vertebrado são dependentes de colesterol e não de ergosterol. O colesterol e o ergosterol

apresentam diferenças estruturais bem características. O ergosterol possui o carbono 24 (C24) da cadeia lateral metilado, e o colesterol não possui substituinte nesta posição. O colesterol possui apenas uma insaturação no anel B (C^{5,6}), enquanto que o ergosterol possui duas insaturações no anel B (C^{5,6} e C^{7,8}) e uma insaturação na cadeia lateral (C^{22,23}). Uma nova geração de derivados azólicos foi desenvolvida, os bis-triazóis. Eles têm demonstrado grande eficácia e atividade contra o *T. cruzi*, agindo sobre alvos específicos do metabolismo de ergosterol, principalmente sobre a enzima C14 α -desmetilase. Com a inibição dessa enzima, não há a formação do zimosterol a partir do lanosterol, interrompendo a biossíntese do ergosterol (Urbina, 1997). Buckner et al., (2003) demonstraram que a enzima C14 α -desmetilase é expressa em todos os estágios de vida do *T. cruzi*, sendo um potencial alvo metabólico para a quimioterapia.

Com as limitações no uso do BZ faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Ainda que se interrompa a transmissão, há um número muito grande de pacientes chagásicos crônicos. No entanto, não tem sido feito investimento da indústria farmacêutica nessa linha de pesquisa, o que classifica a doença de Chagas como uma “doença negligenciada”. Segundo a organização não-governamental DNDI (*Drugs for Neglected Disease Initiative*) apesar de haver um grande número de trabalhos científicos que tratam da biologia, imunologia e genética do *T. cruzi*, não há uma conversão desse conhecimento em novos fármacos. Ao contrário, a doença de Chagas tem sido progressivamente marginalizada por não oferecer um retorno financeiro suficiente para que a indústria farmacêutica invista em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos voltados para seu tratamento (DNDI, 2009). Desse modo, atualmente, a estratégia utilizada na tentativa de resolução deste problema baseia-se na busca de novos alvos moleculares e de fármacos disponíveis comercialmente para outros fins que atuem contra alvos moleculares do *T. cruzi*. Essas duas abordagens serão descritas a seguir.

1.7 Busca de novos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas

Uma das prioridades apontadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o biênio 2008-2009 é a investigação de alvos racionais para o desenvolvimento de fármacos a serem utilizados no tratamento de doenças negligenciadas. Essa investigação, segundo a OMS, tem como estratégia principal a utilização de dados gerados pela genômica e proteômica (WHO, 2007).

Nosso grupo há alguns anos vem estudando a questão da resistência natural do *T. cruzi* a drogas e as bases moleculares dessa resistência, buscando assim a descoberta de novos alvos para a quimioterapia. Em uma primeira análise, (Murta et al., 2001) analisaram a amplificação gênica, transcrição e expressão da P-glicoproteína (PGP), membro da família dos transportadores ABC, que estão relacionados a resistência em outros protozoários, tais como *Leishmania* spp (Ouellette & Borst, 1991). Os autores (Murta e cols., 2001) não observaram associação entre a resistência do *T. cruzi* a fármacos e amplificação ou superexpressão dos genes PGP.

Diante da ausência de correlação da expressão da PGP com o fenótipo de resistência, nosso grupo realizou a busca e seleção de genes e proteínas diferencialmente expressos em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Essa busca foi realizada pelas metodologias de Representation of Differential Expression (RDE) (Murta e cols., 2008), Microarranjos de DNA (*Microarray*) (Murta e cols., 2003, dados não publicados) e proteômica (Andrade e cols., 2008), que revelaram um número significativo de alvos potenciais para serem avaliados. Entre os genes selecionados, Campos e cols. (2004) caracterizaram a *TcHSP70* não observando superexpressão da proteína em cepas sensíveis ou resistentes aos nitroderivados. Por outro lado, Murta et al., (2006), Nogueira et al., (2006 e 2009) e Campos et al., (2009) encontraram correlação da expressão da *TcOYE*, *TcFeSOD-A* e *TcADH* respectivamente, com o fenótipo de resistência *in vitro* do *T. cruzi* a fármacos. Recentemente, Rego et al. (2007) não observaram a mesma associação para a proteína *TcTAT*.

Para o presente estudo, selecionamos: 1) um gene (*TcGluDH*) identificado por *Microarray* como menos expresso na população resistente ao BZ do que na sensível; 2) um gene identificado por RDE (*Tc52*) como mais expresso na população resistente ao BZ do que na sensível e 3) uma proteína identificada por proteômica (*TcAKR*), com expressão aumentada na cepa resistente comparado com a sensível.

1.8 Tiol transferase (Tc52)

As tiol transferases são enzimas amplamente distribuídas em bactérias, leveduras, animais e em alguns parasitos. No *T. cruzi* essa proteína (previamente denominada *TcAc2*) foi identificada por apresentar motivos similares aos encontrados nas sequências de glutationa-S-transferases (GSTs) e em um grupo de proteínas induzidas em diferentes condições de estresse (Schoneck et al., 1994). Tripanosomatídeos não possuem o clássico sistema redox baseado na glutationa (GSH)

e na flavoproteína-NAD que reduz a glutatona dissulfeto (GSSH). Eles produzem um análogo do tiol, a tripanotona, que semelhante a glutatona é importante na prevenção do estresse oxidativo pela oxidação da sua forma dissulfeto (Fairlamb & Cerami, 1985). Entretanto, a existência de concentrações significativas de GSH (entre de 28-45% do total de tiol), sugere um processo enzimático baseado neste componente (Fairlamb e cols., 1992 *in* Moutiez, et al. 1995; Maya et al., 1997). Além disso, a inibição da biossíntese da glutatona reduz o conteúdo de glutatona, sem interferir na concentração de dihidrotripanotona, demonstrando que se trata de mecanismos independentes (Thomson et al., 2003) (Figura 3).

Moutiez e cols. (1995) isolaram a tiol transferase de *T. cruzi* Tc52, com 52 kDa que representa a ligação entre o metabolismo baseado na glutatona presente no hospedeiro e o metabolismo específico do parasito, baseado na tripanotona. Essa enzima, segundo os autores, pode participar da regeneração da glutatona no *T. cruzi*, regulando o balanço redox tiol-dissulfeto pela redução da glutatona dissulfeto. A Tc52 compartilha propriedades estruturais e funcionais com as famílias tioredoxina e glutaredoxina. Como característica molecular, observou-se que as GSTs são todas dímeras à exceção da Tc52 de *T. cruzi* que é monomérica, provavelmente por ser resultante de uma duplicação gênica, sem posterior separação. Isso seria um evento ancestral na evolução. A proteína é composta por dois domínios homólogos que compreendem sítios ligantes para a GSH e para a região C-terminal hidrofóbica (Ouaissi e cols., 2002).

Ouaissi et al. (1995) demonstraram que a Tc52 está localizada em estruturas multivesiculares denominadas reservossomos, que são organelas de pH ácido, semelhantes aos endossomos de mamíferos. Os autores formularam a hipótese de que a Tc52 atuaria seqüestrando os precursores de glutatona do citoplasma e do meio externo, aumentando a concentração interna de glutatona. A glutatona seria utilizada para proteger o parasito de efeitos deletérios de radicais reativos de oxigênio. Além disso, verificou-se a ocorrência da Tc52 apenas nas formas epimastigotas e amastigotas, e não nas tripomastigotas, indicando que sua expressão é regulada e estágio-específica.

Experimentos de proteção imune em modelo murino, sugerem que a Tc52 pode ser usada como molécula candidata ao controle da infecção pelo *T. cruzi* (Ouaissi, et al., 2002). Estudos imunológicos demonstraram que a Tc52 está entre os fatores de virulência do *T. cruzi*, contribuindo para a disfunção gerada pela modulação da

produção de citocinas, expressão do gene iNOS e produção de NO (Ouaissi et al., 1995; Fernandez-Gomez et al., 1998).

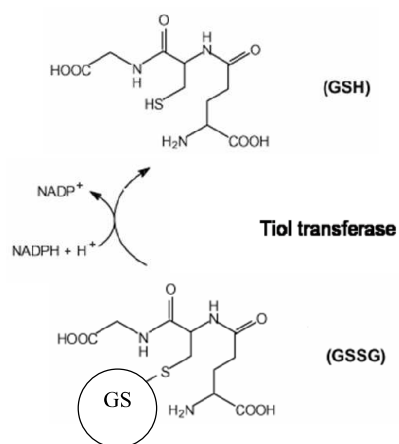


Figura 3: Reação catalizada pela enzima Tiol transferase.

Allaoui et al., (1999) observaram que o parasito tolera a deleção de um dos alelos da Tc52, mas a deleção de ambos os alelos é letal. Isso indica que pelo menos um alelo da Tc52 ativo é requerido para a sobrevivência do parasito. Além disso, o deleção de um alelo do gene não alterou a sensibilidade do parasito ao tratamento com Nifurtimox, Benzonidazol ou com o antimoniato (SbIII). Oury et al. (2005) analisaram a seqüência da Tc52 em 12 clones representativos da diversidade genética do *T. cruzi* para verificar se haveria polimorfismo na seqüência do gene. Os autores observaram que 40 das 400 posições de aminoácidos analisadas são alvos de mutações, sendo algumas pertencentes ou próximas à região ligante GSH.

Sanchez-Burgos et al. (2007) avaliaram a atividade terapêutica da Tc52 como vacina de DNA. Para isso, camundongos ICR infectados com 50 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa H1, foram tratados com 20 μ g de plasmídeo contendo a região codificante da Tc52 nos dias cinco e 12dpi. Os autores verificaram que o tratamento reduziu significativamente a parasitemia e o dano cardíaco, além de aumentar a sobrevivência.

Esses dados demonstraram que a *Tc52* é um bom antígeno candidato para o desenvolvimento de vacina terapêutica para o tratamento da doença de Chagas.

A via dependente de tióis tem sido relacionada ao mecanismo de suscetibilidade/resistência a fármacos, em diversos parasitos. Em *Leishmania* sp. a enzima TDR1 (Redutase Dependente de Tiol) foi associada a redução do antimonial penta em trivalente, utilizando a glutatona como agente redutor. Como essa enzima encontra-se em grande abundância nos estágios de mamífero, esse fato poderia estar associado a maior suscetibilidade do parasito ao fármaco (Denton et al., 2004). No entanto, já estão sendo relatados casos de resistência a esse composto (revisto por Mishra, et al. 2007). Em *Plasmodium falciparum*, a resistência a cloroquina foi relacionada a manutenção mais eficiente do nível de glutatona intracelular por parasitos resistentes (cepa Dd2) quando comparado com a cepa sensível (3D7) (Meierjohann et al., 2002).

1.9 Glutamato desidrogenase (TcGluDH)

As Glutamato desidrogenases (GluDHs) são enzimas de ampla distribuição. Elas constituem um elo importante entre o metabolismo de carbono e o de nitrogênio. Existem três classes de GluDHs: uma presente em animais superiores que podem utilizar como coenzima o NAD(H) ou NADP(H), e duas outras, presentes em plantas, fungos, protozoários e bactérias que requerem estritamente como coenzima o NAD(H) (GluDH-NAD) ou o NADP(H) (GluDH-NADP). Essas classes de GluDHs diferem na estrutura e nas propriedades regulatórias. No geral, quando um organismo possui duas classes diferentes de GluDH, a ligada a NAD é usualmente catabólica e a ligada a NADP⁺ é biossintética, sendo ambas controladas pelos níveis de metabólitos (revisto por Barderi et al., 1998).

O *T. cruzi* é altamente dependente do metabolismo de nitrogênio e tem o amônio como produto final do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Devido à importância desse metabolismo o *T. cruzi* apresenta as duas formas de GluDH. Para Urbina & Azavache (1984), a via de aminoácidos dependente da GluDH, serve como uma fonte geradora de energia para o *T. cruzi*, compensando a deficiência na via reguladora da glicólise. A atividade dessas enzimas é regulada pelos níveis de energia da célula e pela atividade do ciclo de Krebs. Dessa maneira, em condições de estresse nutricional o parasito acumula proteínas exógenas, degradando-as com hidrolases e proteases, obtendo assim uma nova fonte de energia (Urbina et al., 1993). Além disso, outra

importância desse metabolismo, é que o acúmulo de amônia leva a ativação da osmorregulação no *T. cruzi*, com hidrólise de polifosfatos, alcalinização de acidocalcisomas e acidificação citosólica (Rohloff & Docampo, 2006).

A atividade da TcGluDH-NADP⁺ não está muito clara, mas sugere-se que tenha atividade biossintética, reincorporando a amônia na forma de aminoácidos, evitando assim a produção de amônio (Caldas et al., 1980) (Figura 4). Essa enzima foi primeiramente identificada nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (Cazzulo et al., 1977; Walter & Ebert, 1979) onde verificou-se uma maior atividade específica na fase estacionária do crescimento de epimastigotas, quando comparado com a fase logarítmica (Carneiro & Caldas, 1983). A imunolocalização celular da TcGluDH revelou que a enzima encontra-se presente no citosol e na mitocôndria (Duschak & Cazzulo, 1991).

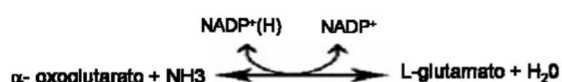


Figura 4: Representação esquemática da atividade da TcGluDH-NADP⁺.

Barderi e cols. (1998) realizaram a caracterização da enzima GluDH-NADP⁺ de *T. cruzi*. Os autores verificaram que a enzima é mais semelhante à GluDH de *Escherichia coli* (70-72% de identidade) do que de outros eucariotos (50-56% de identidade). Pelo perfil de restrição na técnica de *Southern Blot*, foi demonstrado que existem no mínimo três genes que codificam a TcGluDH-NADP⁺ e que estes não estão arranjados em tandem, como freqüentemente ocorre nos tripanosomatídeos. A eletroforese de campo alternado (PFGE) revelou a presença de uma banda cromossomal maior que 2500 bps e outra entre 1035 e 1580 bps. O ensaio de *Northern Blot* revelou a presença de um único transcrito de 2.3Kb, presente em todos os estágios do parasito, porém com mais intensidade na forma epimastigota.

Zuniga et al., (1999) ao realizarem um imunoblotting, verificaram que anticorpos da classe IgM de pacientes chagásicos reconhecem com especificidade a GluDH, da mesma forma que reconhecem antígenos totais da fração alcalina do parasito. Os autores sugerem que a GluDH seria um antígeno candidato a testes diagnósticos e vacinais.

1.10 Aldo/Ceto redutase (TcAKR)

As enzimas Aldo/ceto redutases (AKRs) pertencem a uma superfamília de oxirredutases que realizam a redução de vários aldeídos e cetonas para álcoois (Figura 5). A superfamília AKR consiste de 14 famílias (AKR 1-14) classificadas de acordo com suas estruturas e seqüências (revisto por Xu et al., 2006). Como característica principal a maioria dos membros dessa família são monoméricas e apresentam um motivo do tipo “(β/α)²-barrel” que se liga ao NADPH. Essa enzima é encontrada em protozoários, bactérias, leveduras, plantas, anfíbios e mamíferos, onde apresentam uma diversidade de substratos tais como: aldeídos alifáticos, monossacarídeos, esteróis, prostaglandinas, hidrocarbonetos e isoflavonóides. Em mamíferos as AKRs são alvos de fármacos, principalmente de alguns tipos de câncer como o de próstata, o de mama e do endométrio (revisto por Jez et al., 1997; Gobec et al., 2005).

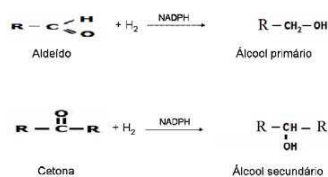


Figura 5: Representação esquemática da atividade catalisada pela Aldo/Ceto Redutase.

O metabolismo de aldeídos, cetonas e álcoois são processos essenciais para procariotos e eucariotos. Em *T. cruzi*, foi feita a caracterização de um membro da superfamília AKR em nosso laboratório. Campos e cols., (2009) caracterizaram a enzima álcool desidrogenase (TcADH) que catalisa a oxidação reversível de etanol a acetaldeído, com conseqüente redução do NAD. O gene TcADH codifica uma proteína com 393 aminoácidos e com alta similaridade a enzima de procariotos. A análise do nível de transcrição do mRNA, expressão da proteína e da atividade enzimática revelou que parasitos resistentes ao BZ apresentam uma redução de 2,5X nesses três fatores, o que correlacionou a ADH com o fenótipo de resistência ao BZ *in vitro*.

Há diversos relatos da associação de AKRs com a suscetibilidade/resistência a quimioterapia em diferentes enfermidades. A superexpressão da AKR foi correlacionada a progressão de diferentes formas de câncer, com aumento da incidência de câncer invasivo e resistência ao tratamento (Tai et al., 2007). Inoue et al., (1993) estudaram o mecanismo *in vitro* de resistência a um tripéptido ligado a um grupo aldeído em duas diferentes linhagens de células CHO-K1. Os autores verificaram que a resistência foi mediada pelo acúmulo de AKR em condições nas quais não houve a superexpressão da glicoproteína-P. Assim, altos níveis de AKR foram relacionados à resistência a compostos tóxicos que requerem um grupo aldeído ou ceto, podendo-se inferir que a AKR participa do mecanismo de detoxificação.

Em bactérias *E. coli*, uma AKR denominada Yghz foi capaz de reduzir o metilglioal, um metabólico tóxico que pode causar dano a macromoléculas, e aumentar a resistência a esse composto através da superexpressão gênica (Grant et al., 2003). Além disso, quando há uma deficiência nos genes que codificam a AKR há um aumento na suscetibilidade ao metilglioal (Ko et al., 2005). A resistência ao metilglioal também foi correlacionada a atividade de detoxificação realizado por uma AKR na cianobactéria *Synechococcus* sp., sendo também observado aumento da atividade na presença de derivados do nitrobenzaldeído (Xu e cols., 2006). Em *Leishmania* sp. a resistência ao metotrexato foi correlacionada a amplificação da região H do DNA, que pela seqüência predita mostrou ter relação com membros da superfamília AKR, mais especificamente com as proteínas polyol desidrogenase e carbonil redutase (Callahan & Beverley, 1992).

1.11 Posaconazol

O Posaconazol - POS ou SCH 56592 (Schering-Plough, Estados Unidos) (Figura 6) é um fármaco anti-micótico de amplo espectro, desenvolvida para atuar sobre infecções fúngicas sistêmicas, invasivas ou para combater fungos resistentes a outros derivados azólicos (aspergilose, candidíase, coccidiomicose, zigomicose e fusariose) (Adis International, 2003). Resultados disponibilizados pela Schering-Plough (2004), relatam que durante a triagem clínica, o POS foi ativo contra 20 diferentes espécies de fungos e demonstrou resultados significativos no tratamento de pacientes com doenças hematológicas graves, tais como leucemia, neutropenia e síndrome mielodisplástica e em pacientes refratários a outros antimicóticos. Os efeitos colaterais observados foram relativamente leves (náusea, vômito e diarreia). A atividade farmacocinética deste

fármaco foi muito bem caracterizada em camundongos, ratos, coelhos, cães e macacos. Em camundongos a meia-vida terminal foi de 7 horas e em macacos foi de 23 horas, o que sugere uma boa permanência nestes modelos (Nomeir e cols., 2000). Courtney e cols. (2003) testaram a farmacocinética e tolerância oral ao fármaco em indivíduos saudáveis após a administração de doses simples ou múltiplas, observando que o fármaco foi bem tolerado e não provocou alterações clínicas significativas (determinadas por exames laboratoriais e eletrocardiograma). A meia-vida foi dose-dependente e variou entre 15.9 e 28.5 horas (com dose única), e 19.2 e 31 horas (com doses múltiplas).

O POS foi testado contra o *T. cruzi* e apresentou efeito sobre as formas epimastigotas e amastigotas *in vitro* (sendo 0.3 nM a concentração mínima para a eliminação do parasito da célula hospedeira). Também verificou-se que este fármaco promoveu um acúmulo de esteróis C-14 metilados e dos precursores do esqualeno. No modelo murino da infecção, demonstrou cura entre 80-100% na fase aguda, contra cepas com diversos graus de resistência aos nitrofuranos, e até 50% de cura na fase crônica (Urbina et al., 1998). Molina e cols., (2000b) testaram a eficácia do POS em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes. Os autores verificaram que a imunossupressão não afeta a atividade do POS se o animal for infectado com uma cepa sensível ou resistente ao BZ, pois ele curou 100% e 50%, respectivamente (atividade semelhante a que ocorre em imunocompetentes). Entretanto, quando os animais imunossuprimidos eram infectados com uma cepa parcialmente resistente ao BZ, a taxa de cura obtida foi reduzida à metade, sugerindo que o POS é parcialmente dependente do sistema imune. Devido aos resultados demonstrados, com evidente ação tripanosomicida, e por ter sido bem tolerado por pacientes em tratamento de infecções micóticas (não causando reações adversas graves), o POS é o fármaco de eleição para ensaios clínicos a serem realizados visando o tratamento da doença de Chagas (Urbina & DoCampo, 2003), com previsão de início no segundo semestre de 2009 (Urbina, J.A., comunicação pessoal).

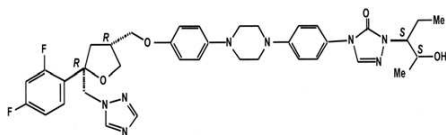


Figura 6 – Estrutura química do Posaconazol.

1.12 Ravuconazol

O Ravuconazol (Bristol-Myers Squibb, Estados Unidos, Figura 7) é um antimicótico sistêmico que atua como inibidor da biossíntese do ergosterol (IBE), sendo eficaz na depleção do ergosterol endógeno ou no acúmulo de intermediários tóxicos (Urbina, 1997). Esse fármaco de amplo espectro foi desenvolvido para atuar sobre infecções fúngicas sistêmicas e invasivas ou para combater fungos resistentes a outros derivados azólicos (aspergilose, candidíase, coccidiomicose, zigomicose e fusariose) (Lorand & Kocsis, 2007) e encontra-se nas fases iniciais de triagem clínica (Aperis & Mylonakis, 2006).

O Ravuconazol (RAVU), assim como os outros bis-triazóis citados acima, também já foi testado experimentalmente para o tratamento da doença de Chagas. A eficácia dessa droga foi verificada *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vitro* anti-*T. cruzi* a concentração mínima inibitória (CIM) do RAVU foi de 300 e 1nM contra formas epimastigotas e amastigotas, respectivamente. Como os outros azóis, a CIM levou a completa depleção dos esteróis C4,14-desmetilados. No modelo experimental murino, o RAVU apresentou altos níveis de cura parasitológica, porém apenas quando administrado duas vezes ao dia. Isso se deve a curta meia-vida terminal deste composto em camundongos (aproximadamente 4 h). A atividade curativa foi restrita a cepas BZ-suscetíveis (cepa CL) e parcialmente resistentes (cepa Y), não sendo observada em cepas resistentes (Colombiana). Não foi observada atividade tripanosomicida no modelo crônico da doença de Chagas, nem efeitos tóxicos. Segundo os autores, o RAVU foi potente e específico contra o *T. cruzi in vitro*, mas sua atividade *in vivo* foi limitada, provavelmente devido as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis em camundongos. De qualquer modo, a atividade potencial do RAV não pode ser desconsiderada (Urbina et al., 2003).

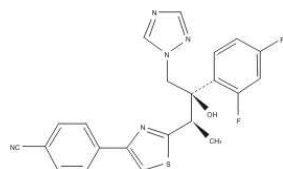


Figura 7: Representação estrutural do inibidor da biossíntese de ergosterol Ravuconazol.

1.13 Amiodarona

A Amiodarona (AMIO, Figura 8) é um fármaco do grupo dos antiarrítmicos da classe III, usado no tratamento das arritmias cardíacas. Os antiarrítmicos da classe III são fármacos que bloqueiam os canais de cálcio e potássio (K^+) presentes nas membranas dos miócitos, prolongando o potencial de ação e, portanto, a contração dos miócitos.

Além das propriedades antiarrítmicas, a AMIO já demonstrou atividade fungicida. Em *Sacharomyces cerevisiae*, a AMIO aumenta o influxo de Ca^{2+} seguido pela fragmentação da mitocôndria e eventual morte celular (Gupta et al., 2003). A análise da resposta transcricional de *S. cerevisiae* a AMIO revelou que nos primeiros 10 minutos de exposição, os genes expressos estavam relacionados a fontes alternativas de carbono e nitrogênio e imobilização de reservas de energia (Zhang & Rao, 2007). Além disso, foi observado uma potente sinergia *in vitro* entre a AMIO e o Itraconazol contra cepas de *Aspergillus fumigatus* suscetíveis e resistentes ao Itraconazol (Afeltra et al., 2004). A atividade fungicida da AMIO também foi observada em *Cryptococcus*, *Candida* e *Fusarium* (revisto por Courchesne, 2002).

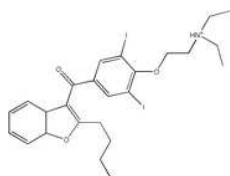


Figura 8 – Estrutura química da Amiodarona.

Recentemente, Serrano-Martín et al., (2009) demonstraram a atividade da AMIO sobre formas promastigotas de *Leishmania mexicana in vitro*. Os autores verificaram que em concentrações terapêuticas, esse fármaco alterou a concentração da 5-dehydroepisterol, resultando no acúmulo da escaloeno, sugerindo que esse fármaco inibe a escaloeno sintase, uma importante enzima da via de biossíntese do ergosterol.

Na doença de Chagas, a AMIO é utilizada para o tratamento das arritmias ventriculares nas doses de 400 mg a 1 g/dia, assim como a quinidina, a mexiletina e o sotalol (Rassi et al., 2000). Além da aplicação normal da AMIO na forma cardíaca da doença de Chagas, foi observado que ela apresenta potente atividade tripanosomicida *in vitro* e *in vivo*. Benaim e cols., (2006) observaram a atividade sinérgica da AMIO com o inibidor da biossíntese de ergosterol, Posaconazol. Os autores observaram que ambos os

fármacos possuem capacidade de afetar a homeostase de Ca^{2+} e a via de biossíntese de ergosterol do *T. cruzi*. Quando utilizadas em associação permitem um nível de cura de 80%, maior do que o grupo tratado apenas com AMIO (0%), grupo não tratado (36%) e do que o grupo tratado apenas com POS (60%).

1.14 Tamoxifeno

O Tamoxifeno (TAM, Figura 9) é um trifeniletileno, modulador seletivo do receptor de estrógeno que é utilizado no tratamento do câncer de mama. Atualmente é o tratamento escolhido para este tipo de câncer e tem seu uso aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a redução da incidência de câncer de mama em mulheres com alto risco de desenvolvimento da doença. Também foi aprovado para a redução da incidência de câncer de mama contralateral (do seio do lado oposto).

Os Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno (MSREs) pertencem a uma classe de medicamentos que agem no receptor de estrógeno. Uma característica que diferencia estas substâncias é a sua capacidade de agir de maneira diferente em vários tecidos. Desse modo, garantem a possibilidade de seletivamente inibir ou estimular a ação estrógena em vários tecidos. No entanto, o TAM apresenta muitos outros efeitos biológicos, independente do metabolismo de estrogênio. Entre essas atividades observou-se a ação de modulação da calmodulina, caspases e quinases (Mandlekar & Kong, 2001), interferência no metabolismo de ceramida (Lavie et al., 1997), inibição da acidificação de organelas intracelulares (Altan et al., 1999; Chen et al., 1999), além da ação sobre lipídios da membrana plasmática e sistema oxidativo (Wiseman et al., 1990; Parvez et al., 2006).

Como o TAM não foi anteriormente testado contra esse parasito, nosso interesse surgiu devido a sua atividade antioxidante e capacidade de acidificar organelas em vários tipos celulares. Cardoso et al., (2004) observaram que o TAM previne a oxidação dos co-fatores NAD(P)H e tiol das proteínas ou ainda bloqueia esses grupos. Parvez e cols., (2006) observaram que o tratamento com TAM leva a redução da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e de enzimas que oxidam a glutatona. Altan e cols., (1999) observaram que o TAM foi capaz de inibir a acidificação de organelas presentes em diferentes tipos celulares, independente da inibição de receptores de estrogênio. Miguel et al., (2007) observaram efeito semelhante em células infectadas por *Leishmania* spp. Segundo os autores, devido a alcalinização do vacúolo parasitóforo o TAM foi capaz de matar as formas promastigotas e amastigotas com um IC_{50} variando

entre 9-20.2µM. Além disso, o TAM foi mais ativo contra formas promastigotas no pH 7.5 do que no pH 4.5. Sendo assim, a ampla atividade do TAM contra potenciais alvos do *T. cruzi* nos levaram a testá-lo contra o *T. cruzi*. Além disso, já foi demonstrada a atividade *in vivo* do Tamoxifeno sobre diferentes espécies de *Leishmania* sp. em modelos de roedores, sendo efetivo no tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral (Miguel et al., 2008 e 2009).

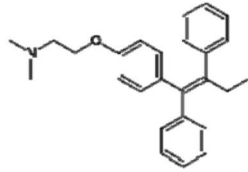


Figura 9: Estrutura química do Tamoxifeno.

2 Justificativa

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário pertencente à família Tripanosomatidae. Além das importantes características genéticas que o diferencia de outros tripanosomatídeos, o *T. cruzi* também apresenta características biológicas singulares. Esse parasito tem os insetos da Ordem Hemiptera (triatomíneos) como hospedeiros invertebrados e mamíferos como hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, onde induz um quadro clínico com características e conseqüências variadas.

A doença de Chagas foi descoberta há 100 anos por Carlos Chagas (Chagas, 1909), e durante esse período se disseminou e tornou-se endêmica em muitas regiões, como conseqüência de precárias condições econômicas e culturais em que vive grande parte da população. Encontrada de forma endêmica do Sul dos Estados Unidos até a Patagônia, a doença de Chagas afeta 10 a 15 milhões de pessoas na América Latina, deixando sob risco de contrai-la cerca de 40 milhões (Schofield et al., 2006). Em Honduras, por exemplo, 1,8 milhões de pessoas habitam áreas endêmicas, e acredita-se que 300 mil estejam infectadas com o *T. cruzi* (DNDI, 2009). As pessoas mais afetadas são as mais pobres, que vivem em casas de pau-a-pique, um habitat apropriado para os insetos. A doença de Chagas mata cerca de 50 mil pessoas todos os anos no continente americano e é a terceira enfermidade tropical mais prevalente, depois da malária e da esquistossomose (DNDI, 2009).

Nos últimos anos, muitos progressos foram feitos em relação à profilaxia da doença de Chagas, principalmente no combate ao vetor. No Brasil, a partir de 1975 foram implementadas diversas medidas para controlar a transmissão, que se intensificaram com a Iniciativa de Controle nos Países do Cone Sul. Através dessa iniciativa, a partir de 1991, houve um amplo combate ao vetor domiciliado (*Triatoma infestans*) e triagem nos bancos de sangue (Dias et al., 2002; Dias, 2007).

Apesar da redução na transmissão e de ser considerado área livre do *T. infestans*, o Brasil ainda é um país endêmico para a doença de Chagas, existindo cerca de 1,5-2 milhões de chagásicos crônicos (OPAS, 2006). Além disso, há um constante risco do estabelecimento de novos focos devido à presença de outras espécies vetoras, aptas a participar do ciclo de transmissão domiciliar em diversas partes do país. Em países como a Bolívia, Venezuela, Equador, Peru e Colômbia a transmissão vetorial continua intensa, principalmente através do *T. infestans* (Dias, 2007).

Clinicamente, a infecção pode levar ao desenvolvimento de complicações cardíacas e digestivas, sobretudo na fase crônica, o que muitas vezes culmina com a morte do indivíduo. A quimioterapia específica é insatisfatória, devido à baixa eficácia e efeitos colaterais gerados pela administração do Benzonidazol, o único fármaco disponível no Brasil para o tratamento.

Devido à gravidade da doença e do elevado número de pacientes chagásicos que ainda vivem sem perspectiva de cura, é fundamental a contínua realização de estudos relacionados a diferentes aspectos da doença, tal como a quimioterapia específica. A presente tese justifica-se pela relevância da questão.

A busca de um fármaco para o tratamento da doença de Chagas encontra alguns desafios que precisam ser transpostos com a finalidade de se obter um tratamento etiológico específico e eficaz. Entre esses objetivos encontra-se a necessidade de que o fármaco seja menos tóxico (sem muitos efeitos adversos), administrada em um esquema de menor tempo e, principalmente, que seja funcional atingindo a cura nas duas fases da doença nos casos. Há também que ser efetiva nos casos em que o chagásico esteja imunocomprometido pela co-infecção com HIV, outras patogenias secundárias ou pelo uso de medicamentos imunossupressores (Ribeiro et al., 2009). Com esse intuito nós realizamos o presente estudo, buscando analisar os parâmetros imunológicos envolvidos na cura da doença de Chagas, testar novas alternativas para a quimioterapia, além de caracterizar potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos.

30 objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar potenciais alvos moleculares e testar a atividade de fármacos candidatos ao tratamento da doença de Chagas experimental.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar os genes de *T. cruzi* que codificam as enzimas: Tiol transferase (Tc52), Glutamato desidrogenase (TcGluDH) e Aldo/Ceto redutase (TcAKR), correlacionando-os com o fenótipo de resistência ao BZ.

- Avaliar o nível de mRNA dos três genes Tc52, TcGluDH e TcAKR comparativamente em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, utilizando Northern Blot e PCR em Tempo Real;
- Determinar a organização genômica dos genes;
- Clonar e expressar as proteínas recombinantes para produção de anticorpos policlonais;
- Avaliar o nível de expressão dessas proteínas nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ;

Testar a atividade dos fármacos Tamoxifeno, Amiodarona e Ravuconazol no tratamento da doença de Chagas experimental.

- Testar a atividade *in vitro* de cada fármaco;
- Testar a eficácia dos fármacos isoladamente ou em combinação no tratamento das fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental;
- Monitorar a sobrevivência e a cura dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com os diferentes fármacos;

Determinar o efeito da ausência de elementos do sistema imune na atividade dos inibidores da biossíntese de ergosterol Ravuconazol, Posaconazol e do Benzonidazol.

4 Material e métodos

A) Caracterização de alvos moleculares para quimioterapia

4.1 Cepas do *Trypanosoma cruzi*

As cepas de *T. cruzi* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. A população 17 de *T. cruzi* resistente ao Benzonidazol (17LER) foi derivada do clone 2 da cepa Tehuantepec (17WTS) (Nirdé et al., 1995), através da exposição a altas concentrações de BZ. Também utilizamos uma população de *T. cruzi* resistente ao BZ (BZR) derivada da cepa Y, selecionada *in vivo* em estudo prévio, após 25 passagens sucessivas em camundongos tratados com altas doses de BZ (Murta & Romanha, 1998). As outras cepas utilizadas foram previamente caracterizadas de acordo com a suscetibilidade *in vivo* ao BZ (Filardi & Brener, 1987). Todas as cepas foram cultivadas em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT – para composição ver o item 3.2.2.7), centrifugado durante a fase exponencial e congelado a -70°C em glicerol 10%, para posterior extração de DNA, RNA e proteínas.

4.2 Manipulação de DNA e RNA

O RNA total das diferentes cepas de *T. cruzi* utilizadas neste estudo foi extraído pelo método de TRIZOL de acordo com as especificações do fabricante (INVITROGEN®, Carlsbad, CA, EUA). O sedimento de parasitos contendo aproximadamente 1×10^9 epimastigotas foi ressuspenso em TRIZOL (vol/vol). Após a adição de clorofórmio, a suspensão foi homogeneizada, incubada por 15 minutos no gelo e centrifugada a $13.400 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo contendo isopropanol 95% e incubado a 20°C por 12-18h. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em água (DDW). A concentração total foi determinada no espectrofotômetro, considerando $260_{\text{nm}} = 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$.

Para obtenção do DNA de *T. cruzi*, o sedimento de parasitos foi ressuspenso em tampão de extração (Tris-HCl 50mM, EDTA 50mM, NaCl 100mM, SDS 0,5% - pH8,0) contendo $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ de proteinase K, por 12h a 37°C . Posteriormente, o DNA foi extraído utilizando: fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 1:1:24 e clorofórmio/álcool isoamílico 1:24. Para precipitar o DNA, adicionamos três volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3M, a -20°C por 12h.

Após esse período, o DNA foi lavado em etanol 70% e ressuspenso em $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0). A concentração de DNA foi

determinada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, comparando com um DNA padrão de concentração conhecida.

Tabela 1 – Cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas nos ensaios de caracterização de alvos moleculares para quimioterapia.

<i>T. cruzi</i>	Origem ^a	Hospedeiro	Sus ^b	Z ^c
17 WT	Mex	Triatominae	S	1
17 LE	Mex	Triatominae	R	1
COLOMBIANA	Col	Caso humano crônico	R	1
YUYU	BA	<i>Triatoma infestans</i>	R	1
SC-28	SC	<i>Didelphis marsupialis</i>	R	1
QUARAIZINHO	RS	<i>Triatoma infestans</i>	S	1
Y (BZS)	SP	Caso humano agudo	S	2
BZR	SP	Caso humano agudo	R	2
Clone 9S	SP	Clone da cepa BZS	S	2
Clone 27R	SP	Clone da cepa BZR	R	2
VL-10	MG	Caso humano crônico	R	2
NOEL	MG	Caso humano agudo	R	2
BERENICE	MG	Caso humano crônico	S	2
ERNANE	GO	Caso humano crônico	S	2
LUNA	Arg	Caso humano agudo	S	B
CL	RS	<i>Triatoma infestans</i>	S	B
CL-BRENER	RS	<i>Triatoma infestans</i>	S	B
Buriti	RS	<i>Triatoma infestans</i>	S	B
MR	RS	<i>Triatoma infestans</i>	S	B
Romano	Arg.	Caso humano agudo	S	B

^a origem – Mex: México; SP: São Paulo; BA: Bahia; SC: Santa Catarina; Arg: Argentina; RS: Rio Grande do Sul; Col: Colômbia; MG: Minas Gerais; GO: Goiás.

^b Sus, suscetibilidade *in vivo* ao BZ e NFX previamente descrito (Filardi & Brener, 1987); S: suscetível; R: resistente.

^c Z, Zimodema – grupo formado por cepas que apresentam o mesmo perfil isoenzimático.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação do DNA de *T. cruzi* foi utilizada a reação em cadeia da polimerase, utilizando os iniciadores listados na Tabela 2. Para cada PCR utilizamos os seguintes reagentes: Tampão de reação 1x (50mM KCl; 1.5mM MgCl₂ e 10nM de Tris-HCl pH 8.5), 200mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dNTPs), 10pmoles de cada iniciador, 1 ng de DNA de *T. cruzi*, 0.5 unidades de Taq DNA Polimerase (INVITROGEN) e água deionizada e bidestilada q.s.p. 10 μ l. A reação foi submetida a amplificação no termociclador, com o seguinte programa: cinco minutos a 94 $^{\circ}$ C seguido por 30 ciclos de: um minuto a 94 $^{\circ}$ C; um minuto a 60 $^{\circ}$ C; um minuto a 72 $^{\circ}$ C. Para a extensão final foi utilizado um ciclo de cinco minutos a 72 $^{\circ}$ C.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para visualização dos produtos de PCR amplificados, 3 μ l de amostra foram ressuspensos em um volume igual de tampão de amostra 2x (Azul de bromofenol 0,08%; Xileno-cianol 0,08%; ficol 10%) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%.

Para polimerização do gel foram utilizados persulfato de amônio 10% (APS) e TEMED 0,05% (N,N,N',N' - tetrametil-etilenodiamina). O padrão de peso molecular utilizado foi o DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima *Hae*III (INVITROGEN®). A eletroforese foi realizada em um sistema de minigel a 100V. Em seguida os géis foram fixados (etanol 10%; ácido acético 0,5%), impregnados por nitrato de prata a 0,2% por 10 minutos e revelados (NaOH 0,75M; Formaldeído 0,1M) até o aparecimento das bandas.

4.5 Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o Kit QIAquick spin (QIAGEN®), utilizando microcentrifuga, de acordo com as recomendações do fabricante. O Kit permite a purificação do DNA amplificado através da sua ligação à coluna e remoção dos demais componentes da PCR. O DNA ligado à coluna foi eluído pela adição de 50 μ l água (DDW) aquecida a 95 $^{\circ}$ C, durante 2 minutos, com posterior centrifugação.

Tabela 2 – Iniciadores específicos utilizados para amplificação dos genes de *T. cruzi* incluídos neste estudo.

<i>Gene</i>	Iniciador Forward – Enzima	Iniciador Reverse - Enzima	Número de acesso
Tc52 Clonagem/sonda	<u>CGAGCTCA</u> ATGCCGCAGTGGTA CAAGGAG – <i>SacI</i>	CCA <u>AGCTT</u> CACCTGCTGCCCAATCA AAAT – <i>HindIII</i>	<i>T. cruzi</i> db:
Tc52 PCR Real Time	GCCTGCGCTACTTCCCAAG	CACCTGCTGCCCAATCAAAT	<u>Tc00.1047053509105.70</u>
TcGluDH Clonagem/sonda	<u>CGCGGATCCC</u> ATGACCTCGCTT TGGCCTTT – <i>BamHI</i>	<u>CGCAAGCTTTT</u> CAAACTACGCCAAG ACCCT – <i>HindIII</i>	Genbank: GI:3080750
TcGluDH PCR Real Time	AGAACGTGAAGCACGGCACT	GCATCTTCAAGCTCCAGTTCGT	
TcAKR Clonagem/sonda	<u>CGCGGATCCC</u> ATGGTGCGGGTC ATCAAG – <i>BamHI</i>	<u>CGCGTCGACTT</u> AGTCGATATGTTCA CT – <i>Sal I</i>	GeneDB Record <u>Tc00.1047053505183.1</u> <u>20</u>
TcAKR PCR Real Time	ACTTTACGGCGATGAGTCTCG	CTCCAACGTGTTCTCGTTGT	
TcHGPRT	<u>CTACAAGGGAAAGGGT</u> CTGC	<u>ACCGTAGCCAATCACA</u> AAGG	Genbank: L07486

*o sublinhado destaca a seqüência correspondente ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição utilizadas para clonagem.

4.6 RT-PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Com o objetivo de obter o DNA complementar (cDNA) para realização da técnica de qPCR, o mRNA das cepas de *T. cruzi* foi utilizado como molde, e convertido com a utilização da enzima transcriptase reversa e do oligo dT. Para a síntese da primeira fita de cDNA utilizamos o mix em um volume final de 20 μ l composto por: 2 μ l de RNA total; 0.5 μ l de oligo d(T); tampão de reação RT 1x; DTT 10mM; dNTP 0.5; 200 unidades de transcriptase reversa Superscript II. Todos os reagentes foram fabricados pela INVITROGEN®. Para a síntese da primeira fita, as reações foram realizadas por 1h a 42°C, sendo inativada pela incubação por 20 minutos a 70°C. O cDNA sintetizada foi diluído 15 vezes em DDW. O produto da reação foi utilizado na PCR quantitativa em tempo real, utilizando iniciadores específicos e o Sistema de Detecção de Sequência Gene-Amp 5700 (PE Applied Biosystem®).

Os iniciadores desenhados para amplificação dos genes *Tc52*, *TcGluDH* e *TcAKR* estão listados na tabela 2, assim como os iniciadores do gene constitutivo *TcHGPRT* (hipoxantina fosforibosil transferase), utilizado para normalizar a quantificação. A qPCR foi realizada em um volume final de 20 μ l contendo: 10pmoles dos iniciadores “forward” e “reverse”; tampão de reação SYBR GREEN 1x (Applied Biosystems®; MgCl₂ 25mM; dNTP 200 μ M; 1 unidade *AmpliTaQ Gold DNA polymerase*); 5 μ l cDNA molde e DDW q.s.p. 20 μ l. Os componentes foram distribuídos em placas de 96 poços, vedada com plástico selante para evitar a evaporação.

Para a amplificação, as condições da PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C/15 segundos; e anelamento/extensão a 60°C/1minuto. A curva-padrão foi feita para cada experimento, utilizando quantidades conhecidas dos plasmídeos TOPO PCR 2.1 (INVITROGEN®) contendo o gene do estudo e o gene *TcHGPRT*. Os resultados foram analisados utilizando o programa “Sequence Detection System” (Applied Biosystem®), que permite a avaliação das curvas de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e o número de cópias conforme a curva-padrão. Os valores foram normalizados através dos obtidos para o gene *TcHGPRT* para cada amostra.

Para análise do nível de mRNA dos genes *TcGluDH* e *TcAKR* por PCR quantitativo em tempo real foi utilizado o método de quantificação relativa Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta$ Ct) com SYBR Green. O gene constitutivo *TcHGPRT* foi usado para normalizar as amostras. Para o cálculo do $\Delta\Delta$ Ct ser válido, foi determinada a curva de

eficiência do ensaio, através do qual o genes alvo e de referência devem apresentar nível semelhante. Para determinar a curva de eficiência para cada gene, foi feita uma diluição seriada do cDNA e o valor de Ct para cada diluição foi medido. A curva foi construída para cada gene e a eficiência em cada faixa foi determinada (Livak & Schittgen, 2001).

4.7 Northern Blot

O RNA total (10-20 μ g) das diferentes cepas de *T. cruzi* foi submetido à eletroforese em gel desnaturante (agarose 1%; tampão MOPS 1X; formaldeído a 7,7%). A eletroforese foi realizada à 20V por 4h em tampão MOPS 1X acrescido de formaldeído 18,7%. O material foi transferido para membrana de náilon durante 20h, na presença de tampão SSC 10X (Citrato de Sódio 0,3M; Cloreto de Sódio 3M). Como marcador de peso molecular foi utilizado o rRNA Ladder. Posteriormente, as membranas foram hibridizadas com sondas específicas marcadas com fósforo radioativo (32 P). Como controle quantitativo, a mesma membrana foi hibridizada com uma sonda correspondente a um fragmento do gene do RNA ribossomal de *T. cruzi*.

4.8 Southern Blot

A análise dos perfis de restrição gerados por diferentes endonucleases, foi realizada pelo método de *Southern Blot*. Aproximadamente 5 μ g de DNA total das cepas de *T. cruzi* foram digeridos com diferentes enzimas de restrição. Essas enzimas foram previamente escolhidas pela condição de não cortar ou cortar uma única vez a sequência do gene de interesse, conforme observado no programa GeneTool Lite® (versão 1.0; DoubleTwist, Inc., Oakland, CA). A digestão do DNA foi realizada a 37°C por aproximadamente 16h. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml). O DNA foi transferido para membrana de náilon (Hybond-Amersham Biosciences®) em tampão SSC 10X (Citrato de sódio 0,3M; Cloreto de Sódio 3M). Posteriormente, as membranas foram hibridizadas com sondas específicas para os genes de interesse marcadas com fósforo radioativo (32 P).

4.9 Eletroforese de pulso alternado (PFGE)

A metodologia de PFGE (do inglês, *Pulse Field Gel Electrophoresis*) foi utilizada para localizar o genes TcGluDH e TcAKR nos cromossomos do *T. cruzi*. Inicialmente, para a preparação dos blocos, os parasitos de diferentes cepas ($\sim 2 \times 10^8$) foram lavados

em solução salina 0,9% e ressuspendidos em solução PSG (NaCl 130mM; Na₂HPO₄ 142mM; Na₂HPO₄ 8mM e glicose 2%). Posteriormente foi adicionado 1% de agarose com baixo ponto de fusão e a solução foi transferida para um molde de acrílico. Após a solidificação, os blocos foram incubados com a solução de lise (sarcosil 3%, Proteinase K 1mg/ml e EDTA 500mM pH 8,0) por 48h a 50°C. Em seguida os blocos foram estocados em EDTA 500mM a 4°C até o uso. A eletroforese de pulso alternado foi realizada utilizando o aparelho Gene Navigator™ System® (Pharmacia). Os blocos contendo as amostras foram colocados nos poços do gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X. A corrida eletroforética foi realizada com uma voltagem constante (180V) a 9°C. Conforme as condições padronizadas no laboratório, foram aplicados pulsos homogêneos (Norte/Sul e Leste/Oeste) de 70s por 15h, 90s por 24h, 200s por 15h e 400s por 15h, sem interpolação. O gel foi corado com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetido a desnaturação ácida e básica e também a neutralização. Posteriormente o DNA foi transferido para uma membrana de náilon (Sambrook e cols., 1989) e hibridizado com sondas específicas para os genes de interesse marcadas com fósforo radioativo (³²P), conforme descrito a seguir.

4.10 Marcação de sondas com ³²P e ensaios de hibridização

As sondas utilizadas para hibridizar as membranas de *Northern Blot* (item 3.2.7) e *Southern Blot* (item 3.2.8) foram obtidas pela amplificação por PCR do DNA da cepa 17LER de *T. cruzi*, com o iniciador específico para cada gene do estudo (Tabela 2). Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados (item 3.2.5) marcadas com [³²P]dCTP conforme protocolo descrito por (Feinberg & Vogelstein, 1983). A pré-hibridização das membranas foi feita em 15ml de solução G (BSA 1%; NaH₂PO₄ 500mM; EDTA 1mM; SDS 7%) (Church & Gilbert, 1984), durante 1h a 55°C. Posteriormente, as sondas desnaturadas (condições: 95°C/5minutos seguido por 5 minutos no gelo) foram adicionadas à solução G e incubadas por 14h à 56°C para *Northern Blot* e 65°C para *Southern Blot*. Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (SSC 2x; SDS 0,1%; água q.s.p. 1000ml) a temperatura ambiente. Após as lavagens, as membranas foram expostas ao filme de raio-X (Kodak®) e incubadas a -70°C. Após três a sete dias, os filmes foram revelados e fixados.

4.11 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes

Para clonagem dos genes *Tc52*, *TcGluDH* e *TcAKR* em bactérias, realizamos uma busca completa de suas sequências nos bancos de dados GenBank e TIGR. A partir das sequências correspondentes à região codificante de cada gene, desenhamos iniciadores específicos. Na sequência dos iniciadores foram adicionadas sequências correspondentes aos sítios de reconhecimento de endonucleases específicas, escolhidas pelo fato de seus sítios de restrição estarem presentes no vetor de expressão pQE-31 (QIAGEN®). As enzimas escolhidas, sequência correspondente ao sítio de restrição e iniciadores para cada gene encontram-se descritos na Tabela 2.

Para a clonagem, foi feita a amplificação da região codificante de cada gene por PCR (item 3.2.3). O produto purificado (item 3.2.5) e o plasmídeo pQE-31 (200 µl) (Figura 10) foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição a 37°C por 3h. Após a digestão, as extremidades do vetor foram desfosforiladas com a enzima fosfatase alcalina (CIAP-Promega®) a 37°C por 1h.

Para purificação, os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Após a corrida, as bandas foram excisadas do gel e purificadas através do Kit Qiaquick (QIAGEN®), utilizando uma microcentrífuga de acordo com as recomendações do fabricante. A eluição final do material purificado foi realizada com 50 µl de água DDW aquecida a 95°C por 2 minutos, seguida da centrifugação da coluna. Em seguida, os produtos foram quantificados no Biophotometer® (Eppendorf®).

O inserto (produto da amplificação por PCR) e o vetor pQE-31, na relação 3:1, foram submetidos à reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs®) por 1h a temperatura ambiente. O produto da ligação (inserto+vetor) foi transformado em bactérias da linhagem TOP 10F' através de choque térmico. A reação procedeu com 10 µl da ligação incubada com 100 µl de células cálcio-competentes por 30 minutos no gelo, seguida por 30 segundos a 42°C.

Após o choque térmico, foi adicionado 1ml de meio LB (Luria-Bertani) para crescimento bacteriano por 1h, a 37°C, sob agitação constante (200rpm – Shaker Forma Scientific®). As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar com 100 µl de ampicilina e incubadas a 37°C por 12h. Algumas colônias de bactérias selecionadas foram submetidas a PCR com iniciadores específicos para cada gene com o objetivo de confirmar a clonagem.

As colônias positivas foram crescidas sob agitação constante (200rpm) por cerca de 12h a 37°C. Posteriormente, a cultura foi utilizada para extração do plasmídeo contendo o inserto através do Kit Mini-Prep (QIAGEN®), conforme as especificações do fabricante. O plasmídeo purificado foi transformado em bactérias *Escherichia coli* da cepa M-15, com a finalidade de induzir a expressão das proteínas recombinantes.

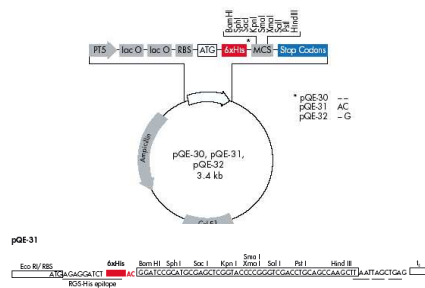


Figura 10 – Representação esquemática do plasmídeo de expressão pQE-31, utilizado para clonagem e expressão das proteínas recombinantes.

A transformação foi realizada por choque térmico, conforme descrito anteriormente neste item. Como meio seletivo, utilizamos LB-ágar contendo 100 $\frac{mg}{L}$ de ampicilina e 25 $\frac{mg}{L}$ de kanamicina. Uma colônia bacteriana positiva (confirmada por PCR) foi incubada em meio LB com 100 $\frac{mg}{L}$ de ampicilina e 25 $\frac{mg}{L}$ de kanamicina, durante 12h a 37°C. Desse material, cerca de 1,5ml foi adicionado a 100ml de meio LB e antibióticos e incubado a 37°C por 3h sob agitação constante. Ao atingir a OD₆₀₀ de 0,5 a 0,7, adicionamos a cultura 1mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) para induzir a expressão da proteína recombinante. Para análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, 1ml da cultura foi colhido antes da indução, e 2, 4 e 6h após a indução. O restante da amostra foi centrifugado a 4000xg por 20 minutos, sendo conservado apenas o pellet para purificação da proteína expressa.

4.12 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A expressão da proteína recombinante foi comprovada através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O gel foi preparado a partir da mistura de N,N'-metileno-bis-acrilamida 0,8% e acrilamida 30%. O gel de separação foi feito a 12% (Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; SDS 0,01%; APS 10%; TEMED 0,05%; água tipo 1) e o de concentração a 4% (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS 0,01%; APS 10%; TEMED 0,05%; água tipo 1). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl, 0,5M, pH 6,8; azul de bromofenol 1%; 2-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%) e fervidas em banho-maria por 5 minutos. A eletroforese foi realizada a 50V para o gel de concentração e 100V para o gel de separação em tampão de corrida (Tris-HCl 25mM; Glicina 192mM; SDS 0,1% - pH 8,3). Após a corrida, o gel foi corado por duas horas com Azul de Comassie (Comassie Blue Brillante R-250 0,25%; Metanol 50%; Ácido acético 10%) e descorado a seguir (Metanol 10%; Ácido Acético 5%).

4.13 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Em uma primeira etapa foi realizada a tentativa de solubilizar as proteínas recombinantes na ausência de sarcosil. Para isso, um volume de 40ml de cultura de bactérias induzidas com IPTG foi centrifugado a 4000xg por 10 minutos. O sedimento resultante da cultura (item 3.2.10) foi ressuspensado em PBS pH 8,0. A seguir, foi adicionado 100µl/ml de lisozima e a mistura foi incubada no gelo por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1mM de PMSF e 5mM de DTT. A amostra foi sonicada três vezes por 15 segundos (pulso 5,0/3,0 em 30% de amplitude), com pausas de 15 segundos no gelo. Após a sonicação, a mistura foi passada 20X pela seringa de 5ml. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante e o sedimento foram colhidos para análise em gel SDS-PAGE.

Para a solubilização de proteínas recombinantes insolúveis com sarcosil as bactérias induzidas com IPTG totalizando um volume de 50ml, foram centrifugadas a 4000xg por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensado em 2,5ml de PBS 1X pH8,0 acrescido de 1mM de PMSF e 20µl/ml de lisozima e incubado no gelo por 15 minutos. A amostra foi homogeneizada e sonicada (3X por 15 segundos com pulso 5,0/3,0 em 30% de amplitude). Após a sonicação, a mistura foi passada em seringa 10 vezes e foi adicionado 1mM de DTT. Em seguida, a amostra foi colhida para análise em gel SDS-PAGE. O sedimento foi ressuspensado em 2,5ml de PBS pH8,0 com 1,5% de Sarcosil

(n-lauryl sarcosil). Posteriormente foi adicionado a amostra 5ml de PBS 1X pH8,0 com 4% de Triton X-100, 1mM de PMSF e 1mM de DTT. Essa mistura foi centrifugada a 10.000xg durante 10 minutos a 4°C. O sedimento e o novo sobrenadante foram colhidos para análise em gel SDS-PAGE.

4.14 Purificação das proteínas recombinantes

Para purificação da *rTCGluDH* utilizamos os métodos de coluna Ni-NTA (QIAGEN®) e eletroeluição e para *Tc52* apenas a eletroeluição. Os métodos serão descritos a seguir. A purificação por cromatografia de afinidade em coluna Ni-NTA (resina de ácido nitrilotriacético com níquel) tem como princípio a associação da coluna à cauda de seis histidinas presente nas proteínas recombinantes expressas em vetor pQE-31. O sedimento de bactérias induzidas com IPTG foi ressuspenso em tampão de lise pH 8.0 – tampão B (NaH₂PO₄ 100mM; Tris-HCL 10mM; imidazol 100mM) e armazenado a temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10.000rpm.

Para cada 4ml de sobrenadante, foi adicionado 1ml de resina Ni-NTA (QIAGEN®) e submetida à agitação por 1h. Após a ligação da proteína na resina, a mistura foi adicionada à coluna (BIORAD®). A seguir, a resina passou por lavagens com os tampões C (pH 6.3), tampão D (pH 5.9) e tampão de eluição E (pH 4.5). Em todos os passos descritos, as frações foram colhidas, assim como alíquotas para análise por eletroforese.

Para purificação por eletroeluição, a suspensão contendo as proteínas recombinantes foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (com canaleta única). Após a corrida a solução foi incubada com KCl 0,1M a 4°C, para precipitar as proteínas. A região esbranquiçada correspondente à proteína foi cortada do gel e acondicionada em sacos de diálise contendo 3ml de tampão de corrida filtrado. Os sacos foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal por 3h a 100V em tampão de corrida. Nos últimos 10 segundos de corrida a corrente foi invertida para que as proteínas se desprendessem do saco de diálise. O tampão foi colhido em alíquotas e armazenado a -20°C.

4.15 Confirmação da identidade da proteína Tc52 recombinante

Com o objetivo de confirmar a identidade da proteína rTc52 expressa, metodologias de proteômica foram utilizadas. Para isso, realizamos uma eletroforese em gel SDS-PAGE 12% com a amostra da proteína rTc52 purificada (conforme descrito no item 3.2.11). Após a corrida, o gel foi fixado utilizando três soluções: Fixador 1 (Ácido ortofosfórico 2%, Etanol 50%, Água), Fixador 2 (Ácido ortofosfórico 2%, Água) e Fixador 3 (Ácido ortofosfórico 2%, Sulfato de Amônia 18%, Água).

Após a etapa de fixação o gel foi corado por aproximadamente dois dias com Azul de Comassie coloidal, que é compatível com a espectrometria de massa. A banda correspondente à proteína recombinante foi excisada do gel e acondicionada em tubos siliconados pré-lavados com metanol-água-metanol. Para descorar o fragmento, foram realizadas três lavagens sob agitação com Acetonitrila 50% e Bicarbonato de Amônio 25mM pH 8.0.

A seguir, a solução descorante foi removida e o gel foi desidratado pela adição de Acetonitrila seguida pela secagem do gel em *Speed Vac* por 15 minutos. Para realizar a redução, a amostra foi incubada por 1h a 56°C em DTT 10mM. A seguir, foi adicionado a amostra o mesmo volume de Iodocetamida 55mM, para a etapa de alquilação em temperatura ambiente por 45 minutos. Os fragmentos do gel foram rehidratados com Bicarbonato de Amônio 25mM pH 8.0, por 10 minutos em vórtex e desidratados com Bicarbonato de Amônio 25mM e Acetonitrila 50%. A fase líquida foi removida e os fragmentos do gel foram secos em *Speed Vac*, seguido pela adição de Tripsina (10µg/ml) por 10 minutos. Após a digestão, os fragmentos foram incubados *overnight* com Bicarbonato de Amônio 25mM a 37°C.

Para a extração dos peptídeos, a solução resultante da digestão e incubação *overnight* foi transferida para um tubo limpo contendo Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50%. O tubo foi incubado por 30 minutos sob constante agitação. Transcorrido o período, as amostras foram concentradas em *Speed Vac* para um volume final de 10µl. As amostras foram congeladas e enviadas para o Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ onde foram concentradas, purificadas e analisadas utilizando o sequenciamento *de novo* em Espectrômetro de massa MALDI-TOF.

4.16 Dosagem de proteínas

A dosagem das proteínas recombinantes e totais de *T. cruzi* foi realizado pelo método de (Bradford, 1976). O ensaio realizado em placa de ELISA, partiu de uma curva-padrão feita com albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações 0,4, 0,8, 1,2 e 1,6 μg por poço. As proteínas recombinantes foram dosadas concentradas ou diluídas (5, 10 e 50 vezes). Após aplicar 20 μl de amostra na placa, foi adicionado 180 μl de reagente de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250; Etanol 95%; Ácido Fosfórico 85%). A placa foi mantida por 5 minutos a temperatura ambiente e submetida a leitura a 595nm em um leitor de ELISA (BIORAD®). A curva-padrão utilizada como base para a dosagem foi determinada através do programa ORIGIN®.

4.17 Obtenção de anticorpos policlonais

Com o objetivo de obter anticorpos policlonais específicos para realização de ensaios de Western Blot, as proteínas recombinantes purificadas foram inoculadas em coelhos *New Zeland White* provenientes da Fazenda da Faculdade de Veterinária, UFMG (Igarapé, MG). Os coelhos, fêmeas com aproximadamente três meses e 2Kg, receberam três inoculações subcutâneas nos dias 0, 7 e 21, com 300 μg de proteína em cada aplicação. Um dos coelhos recebeu apenas a proteína, e o outro recebeu proteína e adjuvante. No dia 0 foi utilizado o adjuvante completo de Freund's (SIGMA®) e nos dias subsequentes o adjuvante incompleto de Freund's (SIGMA®). O sangue foi colhido antes da primeira inoculação (pré-imune), 15 e 30 dias após a última inoculação, através de punção cardíaca realizada por técnico especializado. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 4.000xg, a 4°C por 5 minutos, distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C.

4.18 Extração de proteínas totais do *T. cruzi*

Ao sedimento contendo as formas epimastigotas das diferentes cepas de *T. cruzi* (item 3.2.1) foi adicionado tampão de lise pH 8,0 (NaCl 50mM; Tris-HCl 20mM; detergente NONIDET P-40 SIGMA® 1%), acrescido de uma solução estoque de inibidores de proteases (Leupeptina 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; EDTA 5mM). Após a incubação no gelo por 10 minutos, os parasitos foram lisados por choque térmico (três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio (N_2) líquido (-196°C) e banho-maria a 37°C). A seguir a mistura foi centrifugada a 350xg por 10 minutos a 4°C e o

sobrenadante com as proteínas foi dosado (item 3.2.14), alíquotado e armazenado a – 70°C.

4.19 Western Blot

As proteínas totais de *T. cruzi* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% na concentração de 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}^{\text{Pg}}$ por canaleta. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979) a 100V por 1h no gelo em tampão de transferência (Tris 25mM; Glicina 192mM; Metanol 20% - pH 8.3). Após a transferência, as proteínas foram bloqueadas com TBS-Tween 20 a 0,05% contendo leite em pó desnatado (5%) por 1h. Após as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por cinco minutos e incubada a temperatura ambiente por 1h com o soro do coelho imunizado com a proteína recombinante (anticorpo primário). Após novas lavagens, as membranas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina, diluído a 1:6.000 (PROMEGA®) (anticorpo secundário). Removido o conjugado, as membranas foram lavadas e reveladas com 35 $\frac{\mu\text{L}}{\text{L}}$ e 70 $\frac{\mu\text{L}}{\text{L}}$ dos substratos 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) e nitro-blue tetrazolium (NBT), de acordo com as recomendações do fabricante (BIORAD®). Como controle quantitativo, as mesmas membranas foram incubadas com o anticorpo anti-*rTcHSP70*, utilizado como normalizador por não apresentar diferença no nível de expressão nas diferentes cepas de *T. cruzi* (Campos, 2004).

4.20 Análise densitométrica das imagens

Para análise dos resultados de *Northern Blot* e *Western Blot*, as imagens foram escaneadas e a intensidade das bandas foi analisada no Capturador de Imagens VDS (PHARMACIA BIOTECH®). O programa utilizado foi o ImageMaster VDS software®, onde a intensidade das bandas foram calculadas. Após a normalização consideramos significativos os valores de densidades ópticas superiores a 2X.

B) Caracterização de inibidores para o tratamento da doença de Chagas

4.21 Cepas de *T. cruzi*

Para os ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* foram utilizadas as cepas BZS e BZR, já descritas anteriormente no item 3.1.1. Para os testes *in vivo* utilizamos a cepa correspondente a BZS, ou cepa Y, isolada de um caso humano agudo do município de Marília (SP), através de xenodiagnóstico (Silva & Nussenweig, 1953). Esta cepa é mantida em nosso laboratório através de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos suíços. A cepa é considerada parcialmente resistente ao BZ (Filardi & Brener, 1987; Murta, et al., 1998) e reticulotrópica, ou seja, apresenta tropismo por células do sistema retículo-endotelial (baço, linfonodos, fígado e medula), infectando preferencialmente macrófagos (Andrade & Lopes 1963). Apresenta o predomínio de tripomastigotas delgados no sangue (Brener & Chiari, 1963).

4.22 Estudos da atividade anti-*T. cruzi* *in vitro*

4.22.1 Teste contra formas epimastigotas

As formas epimastigotas das cepas BZS e BZR do *T. cruzi* foram cultivadas semanalmente em meio LIT, suplementado com Soro Bovino Fetal 10% (GIBCO®) e Gentamicina 2,5 µg/ml a 28°C. Para os ensaios de atividade antiproliferativa, as culturas foram iniciadas em uma densidade celular de 2×10^6 epimastigotas/ml e distribuídas em placas de 24 poços. Os fármacos foram imediatamente adicionados em diferentes concentrações ao dobro (12,5 a 800 µM). Após sete dias de incubação, determinamos o IC₅₀ e o MIC (concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos e concentração inibitória mínima de 100% dos parasitos, respectivamente) para cada fármaco através da contagem do número de parasitos em Câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que em cada placa as concentrações eram aplicadas em duplicata. Em todas as placas havia poços contendo parasitos não tratados, utilizados como controle negativo.

4.22.2 Ensaio colorimétrico de suscetibilidade a fármacos, medido pelo Alamar Blue®

Um volume de 5×10^6 /ml formas tripomastigotas de cultura das cepas BZR e BZS foi exposto a diferentes concentrações de BZ, TAM e AMIO em uma placa de 96 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 2 mM Glutamax™ (Gibco). O ensaio foi realizado em triplicata para um volume final de 180 μ l por 48h. Após 24h de cultura, foi adicionado 10% Alamar Blue® (Biosource) e a reação colorimétrica da absorbância foi medida em um leitor de ELISA nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A redução do Alamar Blue® em cada triplicata e o percentual de tripomastigotas inviáveis para cada população do *T. cruzi* foi calculado. A tendência de distribuição foi obtida pela curva sigmoide de dose-resposta e o LC50 (concentração letal para 50% dos tripomastigotas) foi determinado (Microcal Origin v5.0). A atividade anti-trypomastigota (ATac%) foi calculada como a seguir:

$$ATac\% = \frac{100 - [(ALH - (AHW \times RO) \text{ triplicata do teste})]}{(ALH - (AHW \times RO) \text{ controle positivo da triplicata}) \times 100}$$

onde, A_{LH} e A_{HW} representam a absorbância média nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente, e R_O o fator de correção ($R_O = A_{LH}/A_{HW}$ controle negativo).

As concentrações de Amiodarona e Tamoxifeno testadas foram de 8 a 0,0625 μ M.

4.23 Teste *in vivo*

4.23.1 Animais

Este estudo foi desenvolvido com camundongos suíços (Swiss-Webster), com 4-6 semanas de idade e 18-20g, provenientes do Biotério de Criação do Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ, MG, Brasil). Para o teste de cooperação entre o fármaco e o sistema imune, foram utilizados camundongos C57BL/6 (IRR/FIOCRUZ), aqui considerados como “selvagem”. Também foram incluídos camundongos IFN- γ KO, LTCD4⁺KO, LTCD8⁺KO e LBKO provenientes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, SP, Brasil). Os camundongos infectados pelo *T. cruzi* foram mantidos em

condições climatizadas e protegidos por barreiras ambientais no Biotério de Experimentação, recebendo água e alimento *ad libitum*.

4.23.2 Infecção

Para infecção dos camundongos, o sangue foi colhido com pipeta de Pasteur do plexo venoso orbital de camundongos suíços (Swiss-Webster) que estavam no pico de parasitemia. O sangue foi diluído em citrato de sódio 3,8% (1:3 v/v) e injetado por via intraperitoneal em camundongos, com uma seringa de 1ml. Todos os camundongos utilizados em testes de fase aguda foram infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas por animal. A confirmação da infecção foi feita no 4º dia após a infecção (dpi). Para os experimentos de fase crônica, os camundongos foram infectados com 50 formas tripomastigotas sanguíneas por animal e a confirmação da infecção foi entre 4º-9ºdpi.

4.23.3 Parasitemia

Para o modelo de infecção aguda, a parasitemia foi monitorada do 4º ao 60º dpi. Foram colhidos 5 μ l de sangue da cauda dos animais e colocado entre lâmina (26 x 76mm) e lamínula (22 x 22mm). Foi realizada a leitura de 50 campos em microscópio óptico (Zeiss®), com objetiva de 40x, ocular 10x e fator de correção 106. A parasitemia foi determinada segundo (Brener 1962) e corresponde ao número de parasitos visualizados em 50 campos, multiplicado pelo fator de correção do microscópio (número de tripomastigotas x 10³/5 μ l de sangue).

4.23.4 Sobrevivência

A sobrevivência dos camundongos foi acompanhada até 60dpi, através da inspeção diária das gaiolas. As mortes foram anotadas e posteriormente, calculamos o percentual de sobreviventes. Para os testes de fase crônica, as observações prosseguiram até o final dos experimentos aos 180 dpi.

4.23.5 Fármacos

Para os ensaios *in vitro* e para o tratamento *in vivo* foi utilizado BZ ((N-nezil-2-nitro-1-imidazolacetamida, Rochagan®, Roche Brasil), Tamoxifeno (Bioxifeno®, Biossintética – (Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina), Amiodarona (Cloridrato de Amiodarona®, Biossintética, Brasil,

C₂₅H₂₉I₂NO₃,HCl), Ravuconazol (BMS 207,147; [R-(R*,R*)]-4-[2-[2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-thiazolyl]benzotrile) e Posaconazol, ((-)-4-[4-[4-[[[(2*R*-*cis*)-5-(2,4 difluorofenil) - tetrahydro-5-(14 - 1,2,4 - triazol-1-yl-metil) furan -3-yl]] metoxi] fenil]-2-4-dihidro-2-[(*S*)-1-etil-2(*S*)-hidroxipropil]-34-1,2, 4 - triazol - 3 - one), cedido pela Schering-Plough Research Institute, Kenilwort, New Jersey, USA.

Para os testes *in vitro*, os fármacos foram diluídos em DMSO (Dimetil Sulfoxido – SIGMA®). Para os testes *in vivo*, o BZ foi dissolvido em água, contendo 1% de goma arábica. O TAM e a AMIO foram dissolvidos apenas em água. O Ravuconazol foi administrado em água Milli Q, contendo 2% de metilcelulose (Aldrich Chemical Company®) e Tween 80 0,5% (Sigma®). A água foi aquecida a 40°C e a metilcelulose foi adicionada sob agitação, por 20 minutos. Após esse período, a solução foi estocada a 4°C por 30 minutos ou até ficar transparente. Transcorrido o período, foi adicionado o Tween 80, completando o volume (q.s.p. 100ml), homogeneizando por agitação. A solução foi estocada a 4°C.

4.23.6 Tratamento

Para o tratamento dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados na fase aguda da doença de Chagas. O BZ e o TAM foram dissolvidos em água, contendo 1% de goma arábica. Para administração do POS, RAVU e AMIO utilizamos água Milli Q, contendo 2% de metilcelulose (Aldrich Chemical Company) e 0,5% de Tween 80 (Sigma). A água é aquecida a 40°C e a metilcelulose é adicionada, agitando a solução por 20 minutos. Após esse período, a solução permanece na geladeira (4°C) por 30 minutos, ou até que fique transparente. Transcorrido esse período, acrescenta-se o Tween 80, completa-se o volume (q.s.p. 100 ml), agitando até que fique homogêneo. A solução fica estocada a 4°C.

Para os ensaios de fase aguda, o tratamento foi iniciado no 4ºdpi, após a confirmação da presença do *T. cruzi* no exame de sangue a fresco. O tratamento foi realizado durante 20 dias consecutivos por via oral, através de gavagem, utilizando agulha especial (Thomas®) e seringa de 1ml. Para que recebessem a dose individualizada, os camundongos foram pesados semanalmente (Tabela 3).

Para o tratamento de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados na fase crônica da doença de Chagas, os animais sobreviventes, após 120 dias de infecção, sem parasitos circulantes foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos (10 animais

por grupo) e submetidos ao tratamento oral por 20 dias consecutivos, como descrito acima para os camundongos tratados na fase aguda (Tabela 4).

4.23.7 Hemocultura

Nos ensaios de fase aguda e crônica, 30 a 40 dias após o término do tratamento, os camundongos em que não observamos parasitemia aparente pelo exame a fresco, tiveram amostras de sangue colhidas para realização da hemocultura. O sangue colhido assepticamente (cerca de 0.4ml) do seio venoso orbital com pipeta de Pasteur foi distribuído em dois tubos contendo 5ml de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964).

O meio LIT é composto por três soluções:

- ☐ **Infuso de Fígado:** *Liver Infusion Broth* (LIB-DIFCO®) 10% em água bidestilada e autoclavado por 20 minutos;
- ☐ **4X Sais:** 40g NaCl, 4g KCl, 80g NaH₂PO₄ anidro, 50g triptose, 5ml de trietanolamina (SIGMA®) e 250g de hemina (SIGMA®), água bidestilada (q.s.p. 2,5l) – pH 7.4.
- ☐ **Glicose 40%:** Preparada em água bidestilada e autoclavada por 20 minutos.

Para o preparo do LIT, acrescenta-se 25ml de Infuso de Fígado, 125ml de 4X Sais e 5ml de Glicose 40%. Além disso, o meio é suplementado com Soro Bovino Fetal 10% e antibiótico (Gentamicina – 10mg/l). Completa-se a solução final com água bidestilada (q.s.p. 500ml).

Os tubos foram incubados a 28°C, em incubadora BOD, e agitados levemente para aeração, favorecendo assim o crescimento do parasito (Luz, et al. 1994). A leitura da hemocultura foi realizada ao microscópio óptico, após 30 e 60 dias de incubação. A ausência de parasitemia e a negatificação da hemocultura foram os critérios de cura parasitológicos adotados para os testes de fase aguda.

Tabela 3 – Esquema de tratamento dos camundongos tratados na fase aguda da doença de Chagas experimental.

Tratamento	Dose de administração	Número de doses	Dias de tratamento	Número de camundongos
Não tratado	-	-	-	10
Benzonidazol	100mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Ravuconazol	15mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Amiodarona	50mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Ravuconazol e Amiodarona	RAVU (15mg/Kg/dia) e Amio (50 mg/Kg/dia)	RAVU (20 doses) + AMIO (10 doses)	20 dias	10
Amiodarona e Benzonidazol	AMIO (50mg/Kg/dia) e BZ (100mg/Kg/dia)	AMIO (20 doses) + BZ (20 doses)	20 dias	10
Amiodarona e Benzonidazol	AMIO (50mg/Kg/dia) e BZ (50mg/Kg/dia)	AMIO (20 doses) + BZ (20 doses)	20 dias	10
Amiodarona e Benzonidazol	AMIO (50mg/Kg/dia) e BZ (25mg/Kg/dia)	AMIO (20 doses) + BZ (20 doses)	20 dias	10
Tamoxifeno	50mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Tamoxifeno	25mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Tamoxifeno	10mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Posaconazol	20mg/Kg/dia	40 doses (2x ao dia)	20 dias	Variável

Tabela 4 – Esquema de tratamento dos camundongos tratados na fase crônica da doença de Chagas experimental.

Tratamento	Dose de administração	Número de doses	Dias de tratamento	Número de camundongos
Não tratado	-	-	-	10
Benzonidazol	100mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Ravuconazol	15mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Amiodarona	50mg/Kg/dia	20 doses	20 dias	10
Ravuconazol e Amiodarona	RAVU (15mg/Kg/dia) e Amio (50 mg/Kg/dia)	RAVU (20 doses) + AMIO (10 doses)	20 dias	10
Amiodarona e Benzonidazol	AMIO (50mg/Kg/dia) e BZ (100mg/Kg/dia)	AMIO (20 doses) + BZ (20 doses)	20 dias	10
Amiodarona e Benzonidazol	AMIO (50mg/Kg/dia) e BZ (50mg/Kg/dia)	AMIO (20 doses) + BZ (20 doses)	20 dias	10
Amiodarona e Benzonidazol	AMIO (50mg/Kg/dia) e BZ (25mg/Kg/dia)	AMIO (20 doses) + BZ (20 doses)	20 dias	10

4.23.8 Reação em cadeia da polimerase

Como segundo critério de cura nos ensaios de fase crônica foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito na seção 3.4 (Material e métodos). Os iniciadores utilizados foram *Forward* 5'CGCAAACAGATATTGACAGAG3' e *Reverse* 5'TGTTACACACTGGACACCAA3', que amplificam a seqüência correspondente ao DNA satélite de *T. cruzi*, que corresponde a um fragmento de 95pb. Para visualização do resultado foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito na seção 3.5.

4.23.9 Análise estatística

Foram calculados a média e o desvio-padrão da parasitemia dos camundongos tratados e não tratados, utilizando o Microsoft Excel (Windows XP®). Para comparar cada ponto da curva de parasitemia foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, considerando a natureza assimétrica dos valores. A estimativa das taxas de sobrevivência dos diferentes grupos foi calculada através dos métodos não-paramétricos de Kaplan-Meier e comparados pelos testes de Logrank e Wilcoxon. As análises foram realizadas no programa estatístico Minitab (Minitab Inc., State College, PA - USA). Os testes foram realizados com 95% de confiança e considerados significativos quando $p < 0.05$.

5 Resultados

A) Caracterização de potenciais alvos moleculares

5.1 Tiol transferase (*Tc52*)

5.1.1 Organização genômica do gene *Tc52* analisado através de Southern Blot

Com o objetivo de investigar a organização genômica e a possível ocorrência de polimorfismos do gene *Tc52* nas cepas de *T. cruzi*, realizamos o ensaio de *Southern Blot*. O DNA genômico das populações 17WT, 17LER, BZS e BZR foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI*. Essas enzimas foram escolhidas por apresentarem um único sítio interno de restrição no gene *Tc52*, conforme o demonstrado pelo programa GENETOOL LITE LAUNCHER® (versão 1.0; DoubleTwist, Inc., Oakland, CA) (Figura 11). A enzima *EcoRI* foi escolhida por não apresentar sítio de restrição interno no gene.

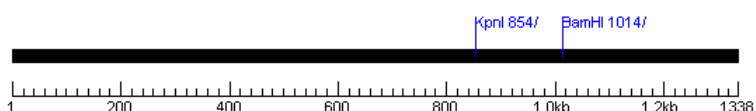


Figura 11: Representação esquemática dos sítios de restrição das enzimas *KpnI* e *BamHI*, no gene *Tc52* conforme demonstrado pelo programa GeneTool Lite®.

O DNA genômico digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, transferido para uma membrana de náilon e hibridizado com a sonda correspondente ao gene *Tc52* inteiro marcado com ^{32}P . Na Figura 12 observamos que o DNA digerido com a enzima *KpnI* apresentou duas bandas, uma de 5,4 e outra de 0,8 Kb (Figura 12A). Duas bandas também foram observadas após a digestão com a enzima *BamHI*, uma de 2Kb e outra de 0,7 Kb (Fig. 12B). Quando a sonda *Tc52* foi hibridizada com o DNA genômico digerido com *EcoRI*, que não possui sítio de restrição na seqüência do gene, observamos uma única banda de 15.4 Kb (Fig. 12C). Também foram avaliadas as cepas Colombiana e CL (dados não mostrados), que apresentaram resultados iguais ao observado para os outros pares. Esses resultados demonstram que provavelmente o gene *Tc52* possui uma única cópia no genoma de *T. cruzi* e que não existem polimorfismos nos sítios de *KpnI* e *BamHI* entre as populações estudadas.

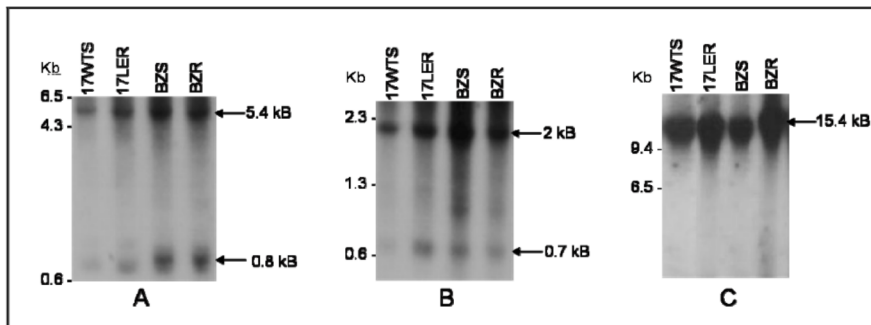


Figura 12: Organização genômica do gene *Tc52* em populações do *T. cruzi* sensíveis (17WTS e BZS) e resistentes (17LER e BZR) ao Benzonidazol. O DNA genômico digerido com as endonucleases A) *KpnI*; B) *BamHI* e C) *EcoRI* foi submetido à eletroforese e transferido para uma membrana de náilon para posterior hibridização com uma sonda específica para o gene *Tc52* hibridizada com ^{32}P . Para maiores detalhes ver *Material e métodos*.

5.1.2 Nível de mRNA do gene *Tc52* em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol

Com o objetivo de observar uma possível relação da enzima Tiol transferase na resistência do *T. cruzi* ao BZ, realizamos o ensaio de *Northern Blot*. Esse ensaio permite determinar o nível de mRNA do gene nas cepas de sensíveis e resistentes ao BZ. Para isto, o RNA total de oito cepas foi separado em gel de agarose 1% desnaturante, transferido para membrana de náilon e hibridizado com sonda específica para o gene *Tc52*, marcado com ^{32}P . O perfil de *Northern Blot* revelou a presença de um único transcrito de 2,3 Kb (Figura 13A). Estudos da intensidade das bandas medida por densitometria normalizando com a intensidade da banda do RNA ribossomal (Figura 13B) mostram que não há diferença no nível de transcrição do gene *Tc52* em nenhuma das cepas estudadas (Figura 13C).

Com o objetivo de confirmar os dados obtidos pelo *Northern Blot*, realizamos um PCR quantitativo em tempo real. A quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada pelo gene constitutivo *TcHGPRT*, que apresenta cópia única no genoma de *T. cruzi*. Inicialmente obtivemos uma curva-padrão utilizando diluições dos plasmídeos ao décimo (10^7 a 10^3 e 10^8 a 10^5) contendo ambos os genes clonados *Tc52* e *TcHGPRT*, respectivamente. Para ambos os genes, a intensidade de fluorescência de

cada amostra é proporcional à quantidade de moléculas de DNA amplificado, e tem como base de análise o C_T (*Cycle Threshold*). Observamos que as linhas foram bastante lineares para a faixa de plasmídeos utilizados para o gene *Tc52* ($r^2=0,995$) e *TcHGPRT* ($r^2=0,999$) o que garante a qualidade dos resultados. Da mesma forma, o gráfico de dissociação para os produtos de PCR amplificados apresentou apenas um único pico, confirmando que um único produto foi amplificado (dados não mostrados).

Para cálculo do número de moléculas de cDNA do *Tc52*, utilizamos os valores de C_T obtidos da curva-padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos contendo o gene, normalizado com os valores de HGPRT. A Figura 14 demonstra que não houve diferença significativa no nível de mRNA do gene *Tc52* das cepas relacionado ao fenótipo de resistência ao BZ, confirmando os resultados obtidos por *Northern Blot*.

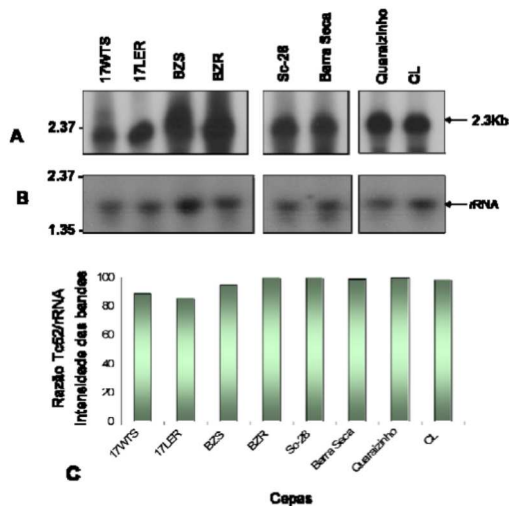


Figura 13: Nível de mRNA do gene *Tc52* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. A) Perfil de *Northern Blot* das cepas de *T. cruzi* hibridizadas com sonda específica para o gene *Tc52* marcada com ^{32}P . B) Controle quantitativo – membrana hibridizada com sonda para o gene constitutivo rRNA. C) Análise densitométrica *D.O.* – Densidade óptica (unidade arbitrária), razão *Tc52*/rRNA.

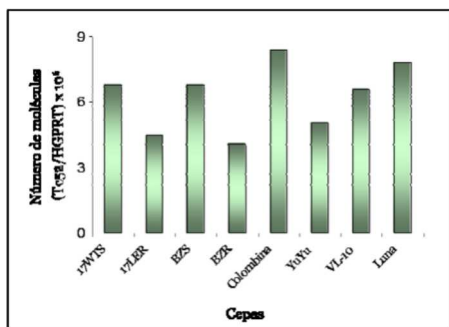


Figura 14: Nível de expressão do mRNA do gene *Tc52* de *T. cruzi* por PCR em Tempo Real (qPCR). Os resultados foram normalizados pelo gene *TcHGPRT*. Para maiores detalhes ver *Material e Métodos*.

5.1.3 Clonagem e expressão da proteína Tiol transferase recombinante

Com o objetivo de avaliar o nível de expressão da proteína Tiol transferase nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, clonamos e expressamos a proteína recombinante *Tc52*. Para a clonagem foi utilizado o vetor de expressão pQE-31 (Qiagen®), que apresenta um peptídeo com 6 histidinas na sua região N-terminal. Parte da região codificante do gene *Tc52* (1163pb dos 1338pb correspondente ao total) e o vetor foram digeridos com as enzimas *SacI* e *HindIII*. O plasmídeo contendo o gene de interesse foi transformado em bactérias TOP10F'. A PCR da colônia demonstrou a eficiência da clonagem pela presença do fragmento de 1163pb, correspondente à parte da seqüência codificante parcial do gene *Tc52* em todas as bactérias analisadas (Figura 15).

Após a clonagem, realizamos a expressão da proteína recombinante em bactérias *E. coli* cepa M-15 através da indução com IPTG a 5mM. O IPTG é um análogo da lactose que promove a saída da proteína repressora do promotor e indução da transcrição gênica e expressão da proteína recombinante. Os extratos bacterianos resultantes da indução foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE. O perfil obtido demonstrou a presença de uma única banda com massa molecular de 46KDa (Figura 16A).

A banda de 46KDa corresponde à parte da proteína recombinante Tiol transferase ligada ao peptídeo de seis histidinas, o que lhe confere esse tamanho. Apesar da Tc52 apresentar 52KDa, o tamanho obtido era esperado porque clonamos apenas parte da seqüência codificante do gene. Observamos que a proteína recombinante não foi expressa na ausência de IPTG e que foi eficientemente expressa com apenas duas horas de indução (Figura 16A).

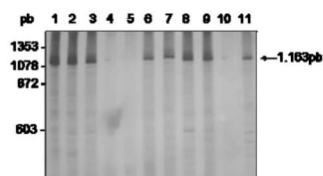


Figura 15: Confirmação da clonagem do gene *Tc52* em bactérias *Escherichia coli*. *pb*- pares de base. 1-11 – colônias de bactérias testadas através da técnica de PCR. Para maiores detalhes ver *Material e Métodos*.

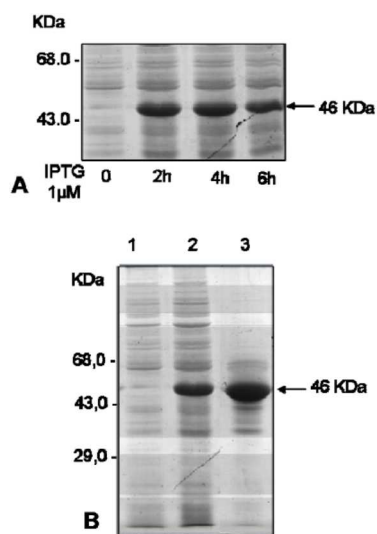


Figura 16: A) Expressão da proteína rTc52. 0h; 2h, 4h e 6h – horas após a indução com IPTG. B) Purificação da proteína rTc52 pelo método de electroeluição. 1- Extrato bruto não induzido; 2 – Extrato bruto induzido e 3 – Proteína purificada.

5.1.4 Confirmação da identidade da proteína rTc52

Em razão da proteína Tc52 recombinante apresentar apenas 46KDa, fizemos a identificação da proteína recombinante expressa utilizando o fracionamento em gel. A banda foi excisada do gel SDS-PAGE 12%, tripsinizada e submetida à identificação molecular por Espectrometria de Massa MALDI-ToF, comparando com um banco de dados de proteína. Os resultados confirmaram a identidade da Tc52, com um *score* de 246 para a Tiol transferase de *Trypanosoma cruzi* (Accession number: gi|32395732). A proteína foi identificada com o sequenciamento de 10% dos peptídeos, tendo massa molecular relativa (M_r) de 48.378 Da e ponto isoelétrico (pI) de 5,22. A Figura 17 apresenta os peptídeos identificados.

```
1 PFCQRLVITA KEKRVTLLEEV EVPLGDDMPQ WYKELNPRET VPTLQVDGKK
51 CMIESDLISR YIDRISSPAN ALMGSSPYQR HRVEFFLGEI GDLVKAYFGL
101 VRDPFNEEKR KSVNNTAYI EDIIAEHQGD GPYFLDDTFS MAEVMVVPFL
151 ACFRPVLSYY WGYDIFHNAP RLKKMYVTSM QRTTVKETIS KPEEYIIGFK
201 SKVVPKSHVTW SLAPGYVLFV NKYSPFSDRP RLACALKNID LPMLEIDLKQ
251 LPPWFRWFNQ RETVPTLLTP QGTYYVESQL IVHYLDDGFP EHGPAALLPKD
301 ADGSYHVRFV ESNVDYFMDA MYSFIKDPKN MNAKEEFDWA AGELEKLLAE
351 HQFGEGPFFG GATMNAADVS LVPMLVHLKA CTPELTEGQD LLANYKLLAA
401 AAEAGLTSEA GKKVFLSLSE YSS
```

Figura 17: Sequência de aminoácidos da proteína Tc52 identificada por espectrometria de massa MALDI-ToF. Em vermelho estão representados os peptídeos sequenciados e identificados por homologia.

5.1.5 Teste de solubilidade e purificação da proteína rTc52

Com o objetivo de determinar a solubilidade da proteína rTc52 para posterior purificação e produção de anticorpos policlonais, realizamos o teste de solubilidade como o descrito na seção “Material e Métodos”. Após a solubilização do extrato protéico bruto em PBS a parte solúvel (sobrenadante) e a insolúvel (sedimento) foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE (Figura 16B). Observamos a presença de uma banda intensa correspondente a rTc52 apenas no extrato de proteínas insolúveis

(sedimento). Esse resultado demonstra que a *rTc52* está sendo expressa pela bactéria sob a forma insolúvel, de acordo com as condições padronizadas.

A purificação da proteína *rTc52* foi realizada por eletroeluição. Após a corrida em gel SDS-PAGE a proteína foi eletroeluída em tampão de corrida de proteína. O gel SDS-PAGE com o produto da purificação (Figura 16B) mostra um alto grau de pureza, com a presença de bandas secundárias contaminantes, correspondentes à proteínas da bactéria que foram eluídas juntamente com a *rTc52*. No entanto, como mostrado a seguir, essas bandas secundárias não interferiram nos anticorpos policlonais produzidos, que foram específicos nos ensaios de Western Blot (Figura 18A). A proteína *rTc52* purificada foi quantificada pelo método de Bradford e apresentou uma alta concentração de 0,8 mg/ml.

5.1.6 Avaliação do nível de expressão da proteína *Tc52*

Apesar de não verificarmos aumento no nível de transcrição do gene *Tc52*, decidimos investigar a expressão da proteína nas diferentes cepas, baseados em resultados do proteoma de *T. cruzi*, que teria indicado diferenças na expressão da proteína em diferentes amostras. Diante disso, foram realizados ensaios de Western Blot, utilizando o soro de coelho imunizado com a proteína *rTc52*.

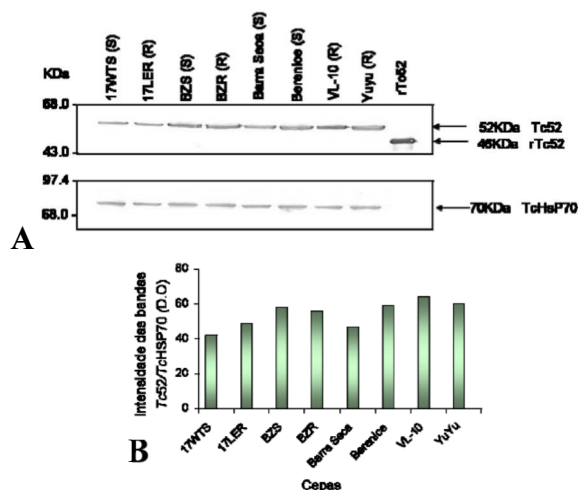


Figura 18: Nível de expressão da proteína Tc52. A) Membrana de Western Blot, incubada com o soro do coelho contendo anticorpos policlonais de coelho anti-*Tc52* e anti-*TcHSP70*. B) Análise densitométrica do nível de expressão da Tc52, normalizado pela proteína HSP70.

O gel contendo as proteínas totais de nove cepas de *T. cruzi* foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, posteriormente incubada com anticorpo policlonal anti-*Tc52* (Figura 18A). O anticorpo policlonal foi utilizado na diluição de 1:1.000 e mostrou-se altamente específico, reconhecendo uma única banda de 52kDa, que corresponde ao tamanho esperado da proteína *Tc52*. Como controle quantitativo, utilizamos soro de coelho contendo anticorpos policlonais anti-HSP70 na diluição de 1:10.000. A análise densitométrica de intensidade da banda correspondente a *Tc52*, normalizada pela referente a HSP70, revelou que o nível de expressão da *Tc52* é independente do fenótipo de resistência ao BZ. Todas as cepas apresentaram nível de expressão similar (Figura 18B).

5.2 Glutamato desidrogenase (*TcGluDH*)

5.2.1 Organização do gene *TcGluDH* analisado através de Southern Blot

Com o objetivo de investigarmos a organização genômica do gene *TcGluDH* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ realizamos o ensaio de *Southern Blot*. O DNA genômico das populações 17WT, 17LER, BZS, BZR, Colombiana e do clone CL-Brener foi digerido com as enzimas de restrição *AvaI* e *EcoRI*. Essas enzimas foram escolhidas por apresentarem um único sítio interno de restrição no gene *TcGluDH*, conforme o demonstrado pelo programa GENETOOL LITE LAUNCHER® (versão 1.0; DoubleTwist, Inc., Oakland, CA) (Figura 19).

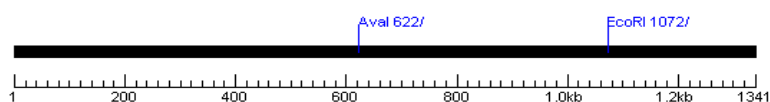


Figura 19: Representação esquemática dos sítios de restrição das enzimas *AvaI* e *EcoRI*, no gene *Tc52* conforme demonstrado pelo programa GeneTool Lite®.

Os ensaios de *Southern Blot* com a enzima de restrição *EcoRI*, hibridizado com sonda específica para o gene *TcGluDH*, revelaram a presença de quatro fragmentos para as populações 17 WTS, 17LER, Colombiana e o clone CL-Brener, com tamanho de 1.14, 1.22, 1.65 e 5.98Kb (Figura 20A).

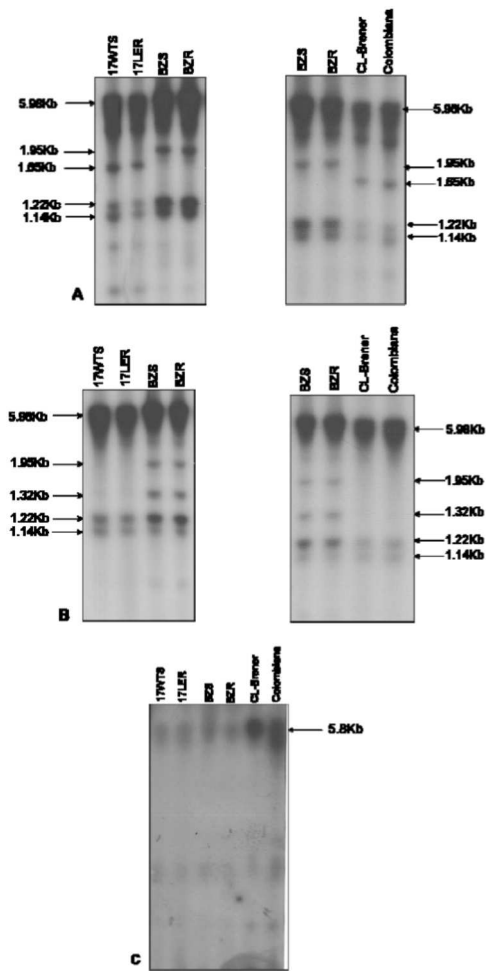


Figura 20: Organização genômica do gene *TcGluDH* em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. O DNA genômico foi digerido com diferentes endonucleases: A) *EcoRI*; B) *AvaI*. C) *BamHI*. Para maiores detalhes ver *Material e Métodos*.

Para as populações BZS e BZR além dos fragmentos observados para as outras populações, observamos a presença de mais um fragmento de 1.95Kb. Esse fragmento pode ser indicativo de um polimorfismo na seqüência do gene *TcGluDH*, que nesse caso estaria relacionado ao zimodema, presente apenas nas populações do zimodema 2 (BZS e BZR) e ausentes nas populações de zimodema 1 (17 WTS e 17 LER e Colombiana) e B (CL-Brener). No entanto, não observamos correlação entre o fenótipo de resistência ao BZ e a presença de polimorfismos, no sítio da *EcoRI*.

Quando analisamos o perfil de restrição obtido com a enzima *AvaI*, que assim como a *EcoRI* também só corta a seqüência do gene *TcGluDH* uma única vez, observamos a presença dos mesmos fragmentos observados anteriormente (Figura 20B). A exceção é um fragmento observado somente nas populações BZS e BZR com 1.32Kb, que novamente mostrou-se relacionado ao zimodema 2. Os nossos resultados confirmam os dados da literatura que descrevem a presença de múltiplas cópias para o gene da *TcGluDH*, e que elas não se encontram arranjadas em tandem (Barderi e cols. 1998). Quando utilizamos a enzima *BamHI* que não possui sítio interno na seqüência do gene *TcGluDH*, observamos a presença de uma banda mais intensa com 5.8Kb (Figura 20C).

5.2.2 Nível de mRNA do gene *TcGluDH* em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol

Com o objetivo de determinar os níveis de expressão do mRNA do gene *TcGluDH* nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos ensaios de *Northern Blot*. O perfil de hibridização do RNA total das cepas de *T. cruzi* com a sonda específica para o gene *TcGluDH* mostrou a presença de dois transcritos, um com 2.2 e outro com 3.8Kb (Figura 21A), presentes em todas as cepas estudadas. Esses dois transcritos estão de acordo com o esperado para *T. cruzi*, uma vez que este parasito apresenta duas GluDHs. Apesar da sonda específica ter sido desenhada para reconhecer apenas uma das GluDHs, houve o reconhecimento das duas formas. Provavelmente isso se deve a alta similaridade das seqüências, que apresentam 97% de identidade.

A análise densitométrica das bandas, normalizadas pelos valores obtidos para o RNA ribossomal (Figura 21B), mostraram diferenças significativas entre o nível de mRNA do gene *TcGluDH* das cepas estudadas. Houve uma redução no nível de mRNA do transcrito de 3.8Kb em cepas resistentes ao BZ, quando comparado com as cepas sensíveis (Figura 21C). Para a cepa 17LER a redução foi de aproximadamente 2,2X,

quando comparado ao seu par sensível 17WTS. Para as cepa Colombiana (resistente) a redução foi de 2,0X quando comparada ao clone sensível CL-Brener. Para a cepa VL-10 a redução foi de 2,2X quando comparado a cepa sensível Ernane e de até 7,0X quando comparado a cepa Berenice. Para a cepa Noel (resistente) a redução foi de 2X quando comparado a cepa Berenice. Para os pares BZS/BZR e Clone9S e 27R não observamos diferença no nível de transcrição do gene *TcGluDH*.

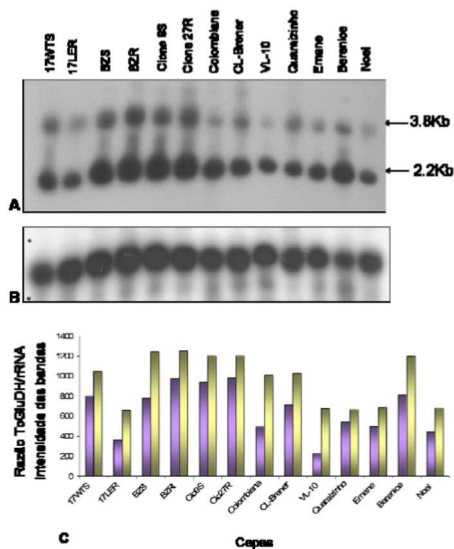


Figura 21: Nível de mRNA do gene *TcGluDH* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. A – Northern blot das cepas de *T. cruzi*; B- Controle quantitativo da mesma membrana hibridizada com a sonda para o gene do RNA ribossomal de *T. cruzi*. C- Análise densitométrica. ■ transcrito de 3.8Kb; ■ transcrito de 2.2Kb.

A análise densitométrica do transcrito de 2.2Kb revelou uma redução no nível de mRNA de cerca de 1,6X na cepa 17LER, quando comparada ao par sensível 17WTS. Para a cepa Noel a redução foi de aproximadamente 1,8X quando comparada à cepa sensível Berenice. Para as demais cepas, não observamos diferenças significativas no nível de transcrição do gene *TcGluDH*.

O nível de mRNA do gene *TcGluDH* foi determinado mais precisamente através de experimentos de PCR quantitativo em tempo real, onde o RNA de cada cepa foi

normalizado através do valor de referência do gene constitutivo TcHGPRT. Os nível de mRNA do gene *TcGluDH* foi 3,7x menor na população 17LER comparada com a população 17WTS, 11,6x menor na cepa Colombiana comparada com a cepa CL e 2,75x na cepa VL-10 comparada com a cepa Berenice. Não foram observadas diferenças no níveis de mRNA das cepas BZS *versus* BZR (Tabela 3).

Tabela 5 – Diferenças no nível de mRNA do gene TcGluDH detectado por RT-PCR

Cepas	Diferenças no nível de mRNA *
17 WTS x 17 LER	3,7
BZS x BZR	1,1
CL x Colombiana	11,6
Berenice x VL-10	2,7

*Diferenças foram consideradas significativas quando a razão dos níveis de mRNA foi ≥ 2 .

5.2.3 Localização do gene *TcGluDH* nos cromossomos de *Trypanosoma cruzi*

Os cromossomos das diferentes cepas de *T. cruzi* foram separados por eletroforese de campo alternado - PFGE (Figura 22A). Após a eletroforese, os cromossomos foram transferidos do gel de agarose para a membrana de náilon e hibridizados com a sonda específica para o gene *TcGluDH*. Observamos um perfil formado por bandas situadas na porção superior da membrana, e de tamanho distinto (Figura 22B). Não foi possível estabelecer correlação entre o perfil de bandas e o fenótipo de resistência ao BZ do *T. cruzi*.

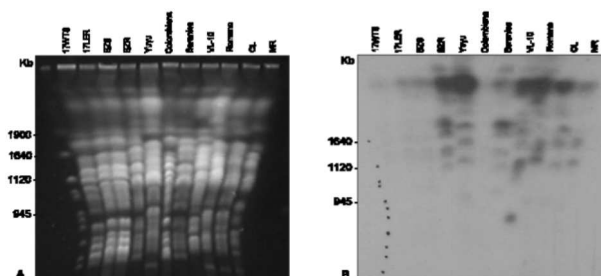


Figura 22: Localização cromossômica do gene *TcGluDH* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. A- Perfil das bandas cromossomais separadas por PFGE e coradas com brometo de etídeo. B- Perfil de *Southern Blot* dos cromossomos de *T. cruzi* hibridizados com sonda específica para o gen *TcGluDH*.

5.2.4 Clonagem e expressão da proteína recombinante Glutamato desidrogenase (rTcGluDH)

Com o objetivo de determinar o nível de expressão da proteína *TcGluDH* nas populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos a clonagem e expressão da proteína recombinante. Para a clonagem, utilizamos o plasmídeo de expressão pQE-31 (Qiagen®) que encontra-se fusionado a um peptídeo de seis histidinas na região N-terminal. A região codificante do gene *TcGluDH* (1341pb) foi amplificada com iniciadores específicos e o produto final foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O mesmo procedimento foi realizado com o vetor para formação das extremidades coesivas e posterior ligação. O produto da ligação foi transformado em bactérias *E. coli* cepa TOP10F' e a clonagem foi comprovada por PCR das colônias. A Figura 23 mostra a alta eficiência na clonagem, com todas as colônias testadas positivas. O resultado foi confirmado pela presença da banda correspondente ao gene *TcGluDH*.

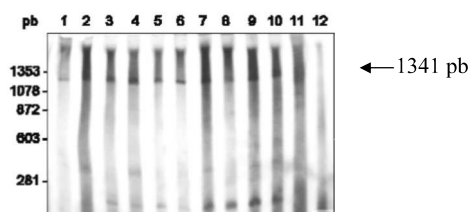


Figura 23: Confirmação da clonagem do gene *TcGluDH* em bactérias *Escherichia coli*. Gel de poliacrilamida 8% corado por nitrato de prata. *Canaletas 1-11*: colônias de bactérias transformadas; *Canaleta 12*: controle negativo, sem extrato bacteriano.

Para a expressão da proteína recombinante, utilizamos a bactéria *E. coli* da linhagem M-15, que foi induzida por IPTG (1mM). Na presença do IPTG as bactérias expressaram a proteína *rTcGluDH* (Figura 24). O perfil da eletroforese mostrou a presença de uma banda de aproximadamente 49kDa, que corresponde ao tamanho da proteína *GluDH* de *T. cruzi* fusionada ao peptídeo de seis histidinas do vetor pQE. A expressão ocorreu com apenas duas horas de indução e não houve aumento da quantidade de proteína expressa após seis horas de indução. Na ausência do IPTG, não houve expressão da proteína recombinante (Figura 24, *Canaleta 2*, NI-não induzido).

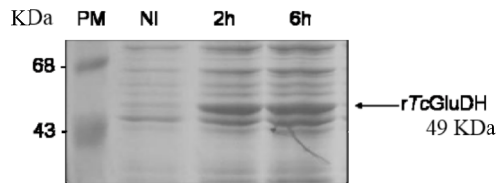


Figura 24: Indução da expressão da proteína recombinante *TcGluDH* com IPTG em bactérias *E. coli* M-15. SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue. *PM*- padrão de peso molecular; NI-não induzido, 0h; 2 e 6h – horas de indução com IPTG.

5.2.5 Teste de solubilidade e purificação da proteína *rTcGluDH*

A fim de estudar as características de solubilidade da proteína *rTcgluDH* expressa, testamos os extratos na presença ou ausência do detergente de sarcosil. Os extratos bacterianos contendo a proteína recombinante foram submetidos ao teste de solubilidade descrito na seção “Material e Métodos”. As proteínas do sobrenadante (solúvel) e do sedimento (insolúvel) foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. O perfil eletroforético demonstrou que a maior parte da proteína é insolúvel e encontra-se no sedimento, e que o sarcosil aumenta a solubilidade das proteínas (Figura 25). A purificação da proteína *rTcGluDH* foi feita por coluna de níquel Ni-NTA (Qiagen®) (Figura 26A) e por eletroeluição (Figura 26B). A eletroeluição mostrou melhor rendimento e pureza. Após a purificação a proteína foi quantificada pelo método de Bradford e apresentou uma concentração de 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

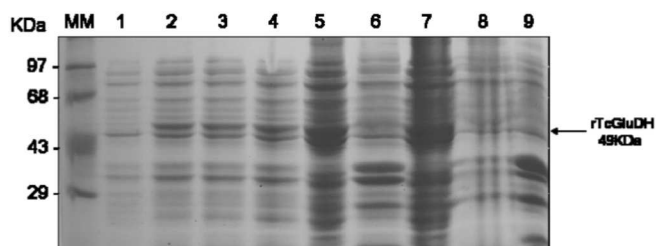


Figura 25: Solubilidade da proteína *rTcGluDH*. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com Azul de Comassie. MM – massa molecular; 1 – Extrato bruto não induzido; 2,3 e 4 – Extrato bruto induzido com IPTG; 5 – Sedimento e 6 – sobrenadante na ausência de sarcosil; 7 – sedimento, 8 e 9 – sobrenadante na presença de sarcosil.

5.2.6 Nível de expressão da proteína rTcGluDH em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol

A proteína rTcGluDH foi utilizada para a imunização de coelhos a fim de produzir anticorpos policlonais anti-rTcGluDH. Os anticorpos produzidos foram utilizados em ensaios de *Western Blot*, com o objetivo de avaliar o nível de expressão da proteína em diferentes cepas do *T. cruzi*. O gel SDS-PAGE contendo proteínas totais do *T. cruzi* com massa molecular de 10 a 100kDa (dados não mostrados), foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, que foi posteriormente incubada com o anticorpo policlonal anti-TcGluDH (Figura 27A).

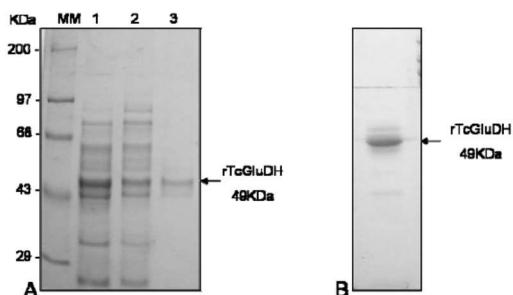


Figura 26: Purificação da proteína TcGluDH. A) Purificação pela Coluna Ni-NTA (Qiagen). MM– massa molecular; 1- Primeiro sobrenadante; 2- Segundo sobrenadante; 3- proteína eluída. B) Proteína eletroeluída.

Para quantificar os níveis de expressão da proteína rTcGluDH, a mesma membrana foi incubada com anticorpos policlonais anti-TcHSP70. A análise densitométrica utilizando a TcHSP70 (Figura 27B) como referência, mostrou que houve uma diminuição da expressão nas populações resistentes ao BZ (Figura 27C). Essa redução foi de aproximadamente 3,0X na população com resistência induzida *in vitro* 17LER, com relação ao seu par sensível 17WTS. Também foi observada redução nas populações naturalmente resistentes ao BZ. Para a cepa resistente Noel a redução foi de 2,0X em relação à cepa sensível Berenice, pertencente ao mesmo zimodema (zimodema 2). Já para a cepa resistente Colombiana (zimodema 1), não foi possível analisarmos a redução na expressão pois a banda correspondente não esteve presente na amostra, apesar da grande quantidade de proteína adicionada na canaleta, observar a intensidade

da banda da TcHSP70 (Figura 27B). Para excluirmos a possibilidade que a amostra da Colombiana estava degradada, repetimos o experimento com duas outras preparações que mostraram o mesmo resultado (dados não mostrados). Desse modo, temos a indicação de uma forte redução na expressão da GluDH nessa cepa, de maneira que não foi possível detectá-la com a utilização do anticorpo produzido.

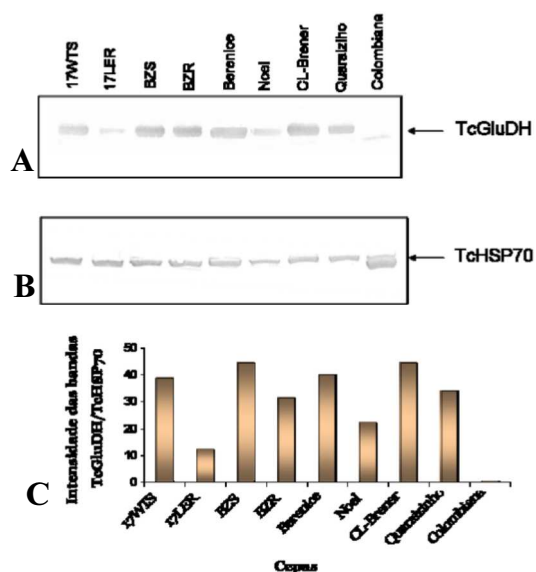


Figura 27: Nível de expressão da proteína TcGluDH. A) Membrana de Western Blot, incubada com o anticorpo policlonal de coelho anti-TcGluDH e B) anticorpos anti-TcHSP70; C) Análise densitométrica do nível de expressão da TcGluDH, normalizado pela proteína HSP70.

5.3 Aldo/Ceto redutase

5.3.1 Organização genômica do gene *TcAKR* analisado através de Southern Blot

Para avaliar o perfil genômico do gene *TcAKR* através da técnica de *Southern Blot*, utilizamos a enzima de restrição *KpnI* (Figura 28) que apresenta um único sítio de restrição na seqüência do gene *TcAKR*, e a enzima *XhoI* que não apresenta sítio de restrição na seqüência gênica. Ensaios realizados com a enzima *KpnI*, hibridizado com

uma sonda específica para esse gene revelaram a presença de fragmentos de 0.48, 0.98, 1.36 e 8.2 Kb (Figura 29A), independentemente da resistência ao BZ ou ao zimodema. O perfil observado sugere que o gene apresenta múltiplas cópias organizadas em tandem. Como esperado, a enzima *XhoI* não digere internamente o gene *TcAKR*, o que mostra uma única banda de 7.9Kb (Figura 29B).

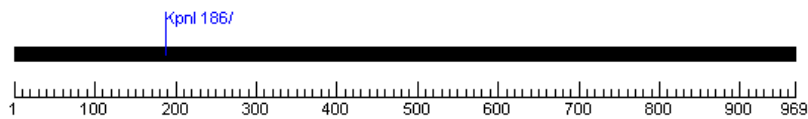


Figura 28: Representação esquemática do sítio de restrição da enzima *KpnI*, no gene *TcAKR* conforme demonstrado pelo programa GeneTool Lite®.

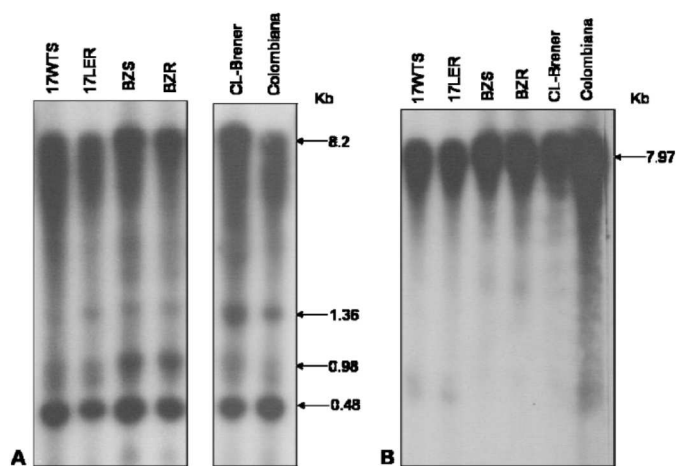


Figura 29: Organização genômica do gene *TcAKR* em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. O DNA genômico foi digerido com as endonucleases A) *KpnI* e B) *XhoI*.

5.3.2 Nível de mRNA do gene *TcAKR* em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol

Com o objetivo de investigar o nível de transcrição do mRNA do gene *TcAKR* nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos ensaios de *Northern Blot*. A hibridização com sonda específica revelou a presença de dois transcritos de 1.02 e 2.05Kb presentes em todas as populações do *T. cruzi* estudadas (Figura 30A). Os dois transcritos correspondem aos dois genes *AKRs* descritos no sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed e cols. 2005).

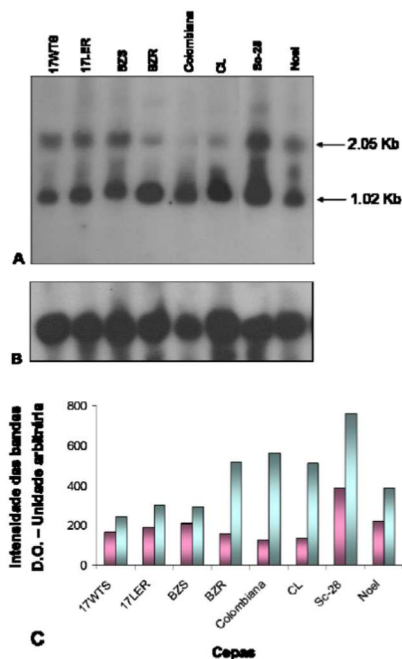


Figura 30: Nível de mRNA do gene *TcAKR* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. A – Perfil de *Northern blot* das cepas de *T. cruzi*; B- Controle quantitativo da mesma membrana hibridizada com a sonda para o gene do RNA ribossomal de *T. cruzi*. C- Análise densitométrica. ■ – Transcrito de 2.05Kb; ■ - Transcrito de 1.02Kb

A análise densitométrica, utilizando o rRNA (Figura 30B) do transcrito de 1.02 Kb, detectou um aumento no nível de mRNA da TcAKR em cepas de *T. cruzi*, resistentes ao BZ. Esse aumento foi de 3x na cepa BZR, quando comparado com seu par sensível BZS e de 3x para a cepa SC-28, quando comparado ao seu par sensível Noel (Figura 30C). Para as demais cepas, assim como para o transcrito de 2.05Kb, os níveis de mRNA foram similares. A análise do nível de mRNA através da técnica de PCR quantitativo em Tempo Real, não revelou diferença significativa entre os pares de cepas analisados (Tabela 4).

Tabela 6 – Diferenças no nível de mRNA do gene TcAKR detectado por RT-PCR

Cepas	Diferenças no nível de mRNA *
17 WTS x 17 LER	0,5
BZS x BZR	1,3
CL x Colombiana	1,3
Berenice x VL-10	1,5

*Diferenças foram consideradas significativas quando a razão de mRNA foi ≥ 2 .

5.3.3 Localização do gene *TcAKR* nos cromossomos de *Trypanosoma cruzi*

Os cromossomos de *T. cruzi* separados por eletroforese em gel de agarose (Figura 31A), foram transferidos para membrana de náilon e essa membrana foi posteriormente incubada com sonda específica para o gene *TcAKR* (Figura 31B). Após a hibridização, observamos perfis complexos de bandas, que foram cepa-específicos, e que aparentemente não estão associados com o fenótipo de resistência ao BZ e nem com o zimodema das cepas.

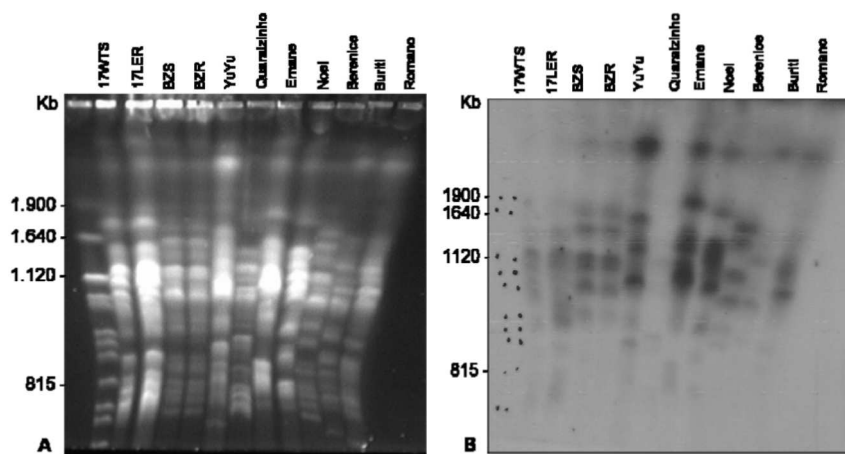


Figura 31: Localização cromossômica do gene *TcAKR* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. A- Perfil das bandas cromossomais separadas por PFGE e coradas com brometo de etídeo. B- Perfil de *Southern Blot* dos cromossomos de *T. cruzi* hibridizados com sonda específica para o gene *TcAKR* marcada com ^{32}P . O marcador de peso molecular são os cromossomos de *Sacharomyces cerevisiae*.

5.3.4 Clonagem e expressão da *TcAKR*

Para analisar a expressão da proteína TcAKR nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol, foi realizada a tentativa de expressão em bactérias *Escherichia coli* M-15 transformadas com o vetor de expressão pQE. A clonagem em bactérias da cepa M-15 foi bem sucedida (Figura 32A). No entanto, não foi possível realizar a expressão da proteína TcAKR, apesar das tentativas com alteração dos principais fatores envolvidos na expressão da proteína, tais como temperatura, meio de cultura, tempo de crescimento e quantidade de IPTG (Figura 32B). Desse modo, não foi possível realizar a expressão da proteína recombinante utilizando o sistema heterólogo *E. coli*, o que impossibilitou a obtenção de anticorpos policlonais para os ensaios de Western blot.

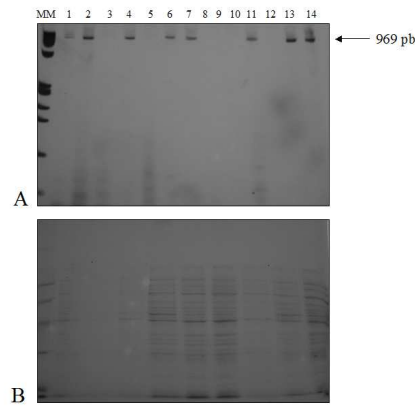


Figura 32: Clonagem e expressão da proteína TcAKR. A) Gel de poliacrilamida a 8%, corado pela prata. Bactérias M-15 transformadas com vetor de expressão pQE-31, contendo o gene TcAKR. 2, 4, 6, 7, 11, 13 e 14 – colônias positivas. B) SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue. Tentativa de expressão da proteína, após a indução com IPTG.

B) Caracterização da atividade de fármacos candidatos ao tratamento da doença de Chagas

5.4 Caracterização da atividade tripanosomicida de fármacos disponíveis comercialmente para outros fins

5.4.1 Tamoxifeno – avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*

Com o objetivo de verificar a possível atividade tripanosomicida do Tamoxifeno (TAM), realizamos o teste contra formas epimastigotas, conforme descrito em Material e Métodos. Nos testes, utilizamos o Benzonidazol (BZ) como controle. O TAM apresentou forte atividade tripanosomicida contra as cepas sensíveis e resistentes ao BZ (Tabela 5). Para a cepa BZS a concentração inibitória mínima (MIC) letal para 100% dos parasitos foi de 50 μM e o IC_{50} foi de aproximadamente 12 μM , enquanto para o BZ os valores correspondentes foram 200 μM e aproximadamente 24 μM , respectivamente. Contra a cepa resistente (BZR) o TAM foi da mesma forma potente, apresentando o mesmo valor de MIC (50 μM) e de IC_{50} de aproximadamente 16 μM . Para a cepa BZR

não foi possível determinar o MIC, uma vez que na concentração mais alta possível de ser testada (800 μM) foi observada a presença de raros parasitos. O IC_{50} foi de aproximadamente 42 μM .

A atividade do TAM contra as formas tripomastigotas (Figura 33) oriundas de cultura de células, a LC_{50} para a população BZR foi 0,77 μM (Figura 33) e não diferiu da observada para a população BZS. Para o BZ os valores obtidos de IC_{50} para a cepa BZR foi de 95,4 μM , e aproximadamente 8X maior do que para a cepa BZS, que apresentou o valor de 12,1 μM . Nossos resultados mostram que o TAM apresenta atividade anti-*T. cruzi* superior a atividade *in vitro* do BZ, sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas. No entanto, para desenvolver a atividade tripanosomicida foi necessário uma quantidade muito inferior de TAM, quando comparado ao BZ. Além disso, o TAM foi igualmente ativo contra as cepas BZR e BZS.

Tabela 7 – Atividade *in vitro* do Tamoxifeno e do Benzonidazol sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

EPI-MASTIGOTAS				TRIPO-MASTIGOTAS		
		IC_{50} (μM)	MIC (μM)			LC_{50} (μM)
TAM	BZS	12	50	TAM	BZS	0,7
	BZR	16	50		BZR	0,7
BZ	BZS	24	200	BZ	BZS	12,1
	BZR	42	N.D.		BZR	95,4

IC_{50} – Concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos

MIC – Concentração inibitória mínima, letal para 100% dos parasitos

LC_{50} – concentração letal para 50% dos parasitos

N.D. – não determinado – efeito não observado quando a dose máxima usada.

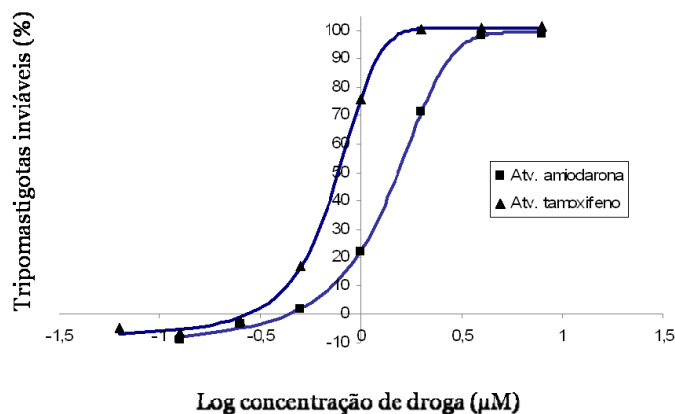


Figura 33: Atividade do Tamoxifeno e da Amiodarona em ensaios de atividade tripanosomicida *in vitro* contra formas tripomastigotas da cepa BZR de cultura de células.

Avaliamos a atividade do TAM em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados com 10, 25 e 50mg/Kg por 20 dias consecutivos. O BZ foi administrado como controle, na dose de 100mg/Kg/dia por 20 dias. A parasitemia e a mortalidade foram observadas até 60 dias após a infecção (dpi), quando realizamos a hemocultura.

Os camundongos Swiss-Webster infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e não tratados, apresentaram um pico de parasitemia no oitavo dia após a infecção (Figura 34A). O tratamento dos camundongos com as diferentes doses de TAM não teve efeito sobre a parasitemia (Figuras 34, 35 e 36A). Além disso, observamos uma relação inversa entre a dose de TAM administrada e a mortalidade foi maior nas doses mais altas de TAM (Figura 34, 35, 36B), sugerindo ausência de efeito sobre o *T. cruzi* e/ou toxicidade para os camundongos. A Tabela 7 mostra a sobrevivência.

Devido ao fato do TAM ser um fármaco com ação sobre hormônios femininos e de que todos nossos testes anteriores foram realizados com fêmeas de camundongos, realizamos o teste experimental em uma amostra constituída por machos. Esse teste foi realizado para verificarmos se a atividade de modulação do receptor de estrogênio do TAM poderia afetar sua atividade tripanosomicida *in vivo*. Para o experimento,

camundongos machos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foram submetidos ao tratamento com TAM na dose de 50mg/Kg/dia ou BZ como controle. Como demonstrado na Figura 34, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os camundongos machos e fêmeas tratados com TAM, com relação a parasitemia, mortalidade e cura. Desse modo, verificamos que não há correlação da potente atividade tripanosomicida do TAM *in vitro* com sua atividade *in vivo*, mesmo quando excluído a possível atividade sexo-específica.

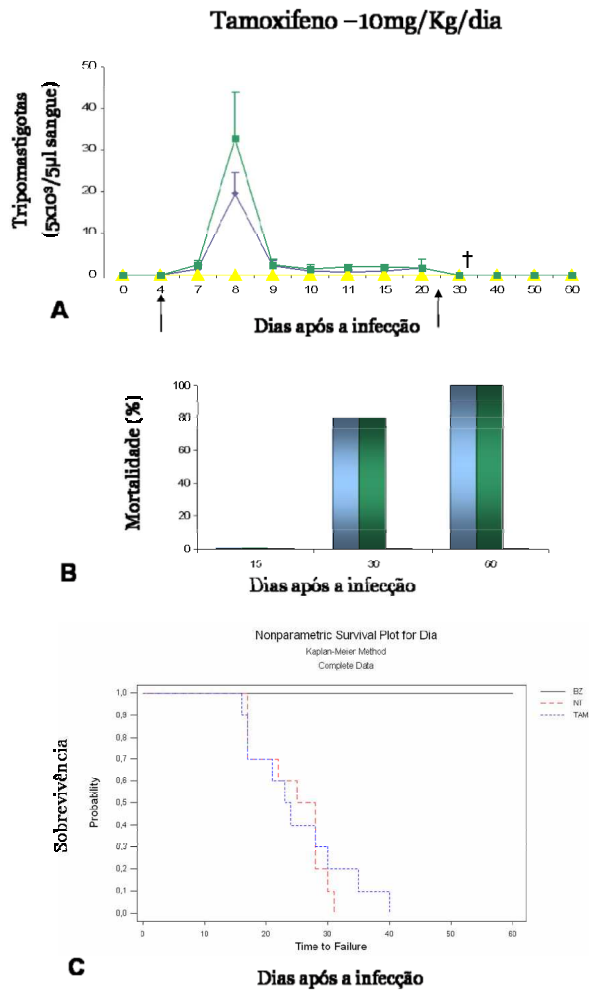


Figura 34: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com ■ Tamoxifeno 10mg, ■ Benzonidazol e ■ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

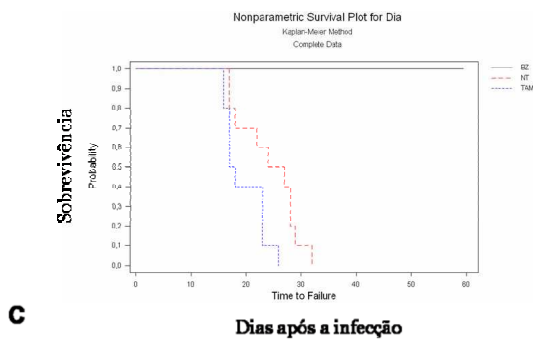
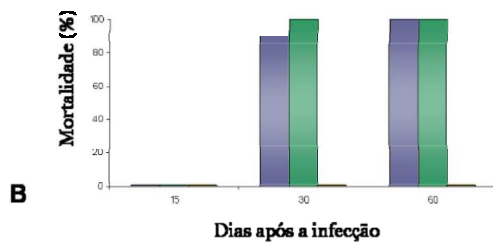
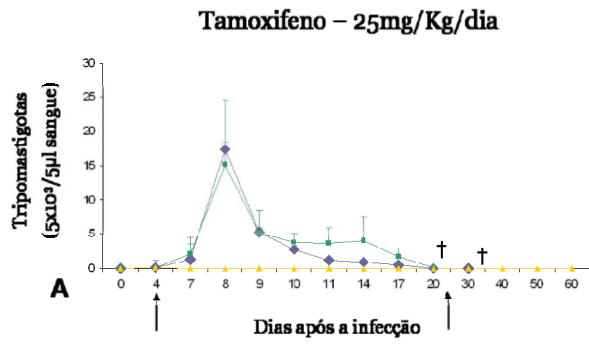


Figura 35: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com ■ Tamoxifeno 25mg, ■ Benzonidazol e ■ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

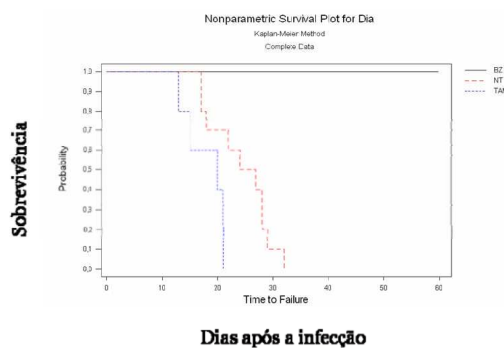
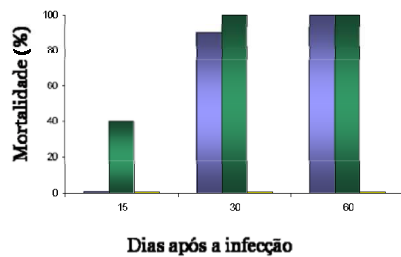
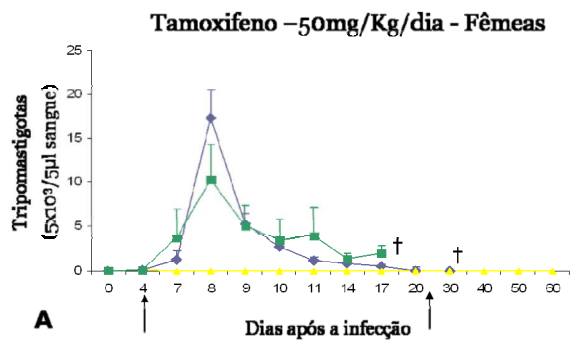


Figura 36: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com Tamoxifeno 50mg, Benzimidazol e não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

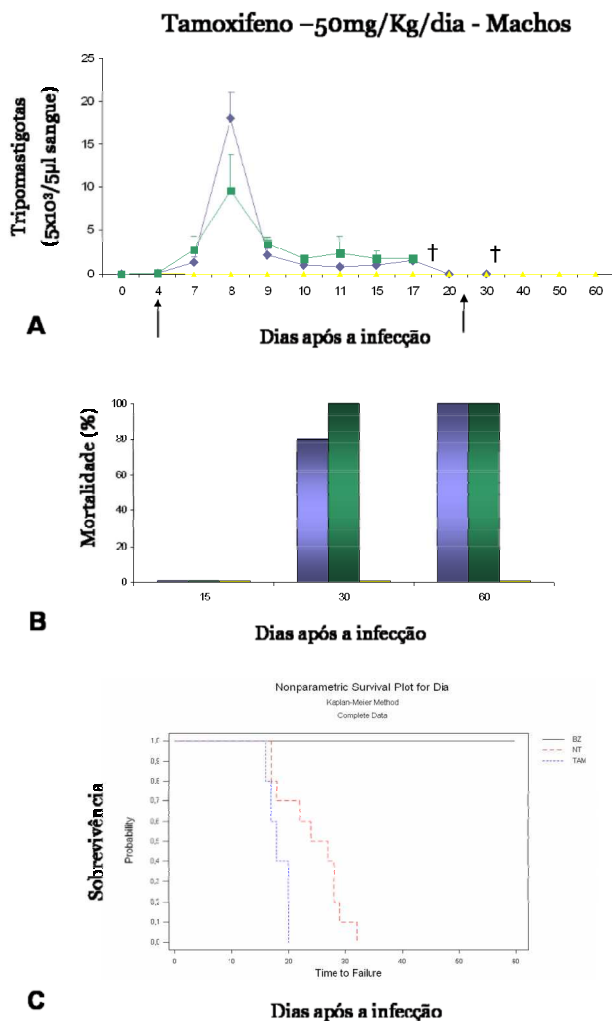


Figura 37: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos machos infectados com *T. cruzi* e tratados com ■ Tamoxifeno–50mg, ■ Benznidazol e ■ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

5.4.2 Amiodarona – avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*

Com objetivo de determinarmos o IC₅₀ e o LC₅₀ da AMIO contra formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, realizamos os testes de atividade *in vitro*. A AMIO apresentou potente atividade tripanosomicida contra as cepas sensíveis e resistentes ao BZ (Tabela 6).

Tabela 8 – Atividade *in vitro* da Amiodarona e do Benzonidazol sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

EPIMASTIGOTAS				TRIPOMASTIGOTAS		
		IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)	LC ₅₀ (µM)		
AMIO	BZS	12	50	AMIO	BZS	1,56
	BZR	19	50		BZR	1,56
BZ	BZS	24	200	BZ	BZS	12,1
	BZR	42	N.D.		BZR	95,4

IC₅₀ – Concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos

MIC – Concentração inibitória mínima, letal para 100% dos parasitos

LC₅₀ – concentração letal para 50% dos parasitos

N.D. – não determinado – efeito não observado quando a dose máxima foi usada.

Para avaliação *in vivo*, a AMIO foi administrada sozinha ou em combinação com o RAVU e o BZ. Associação da AMIO ao RAVU foi testada, devido aos resultados obtidos por Benaim e cols. (2006) na associação da AMIO a outro inibidor da biossíntese de ergosterol, o Posaconazol. Além disso, a proposta de associação da AMIO ao BZ, deve-se a hipótese de que a associação poderia proporcionar uma redução da dose administrada de BZ, o que acarretaria em uma redução nos efeitos colaterais. Nos primeiros testes, camundongos infectados pelo *T. cruzi* foram tratados com AMIO durante 20 dias na dose de 50mg/Kg/dia, tendo como controles camundongos tratados com BZ ou não tratados. A Figura 38A mostra a curva de parasitemia, onde observamos

que os camundongos tratados com AMIO apresentaram um pico parasitêmico no oitavo dia após a infecção, com nível de parasitos menor do que os camundongos do grupo não tratado, no entanto, sem diferença significativa. Além disso, esses camundongos apresentaram raros parasitos circulantes até 50dpi; após esse período, a parasitemia tornou-se subpatente. Os camundongos tratados com BZ tornaram-se negativos após o 4^o dpi, permanecendo assim até o término de nossas observações (60dpi).

Com relação à mortalidade (Figura 38B), os camundongos não tratados apresentaram a taxa de 100% aos 32dpi. Para os camundongos tratados com AMIO e BZ não observamos nenhuma morte até os 60 dpi. A análise da sobrevivência (Figura 38C e Tabela 7) revelou uma diferença significativa entre os camundongos que receberam AMIO e BZ dos camundongos não tratados. O tratamento com ambos os fármacos promoveu aumento significativo na sobrevida dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* ($p < 0,0001$). A taxa de cura observada para os camundongos tratados com BZ foi de 70%, enquanto que para os camundongos não tratados e tratados com AMIO não observamos cura parasitológica (Tabela 7).

5.5 Associação de fármacos para o tratamento da doença de Chagas

5.5.1 Amiodarona e Benzonidazol

Apesar de não ter sido capaz de promover a cura parasitológica, a AMIO mostrou-se eficaz na proteção contra a morte e na redução da carga parasitária. Em razão disso, e de relatos anteriores (Benaim e cols., 2006), partimos para a investigação da associação da AMIO a outros fármacos (BZ e RAVU) a fim de verificarmos uma possível cura parasitológica. A associação de dois ou mais fármacos pode ser uma alternativa para a questão da quimioterapia, pois dessa maneira haveria potenciação do efeito individual, o que talvez permitiria a redução na dose administrada e evitaria a resistência. Assim, poderíamos também reduzir os efeitos colaterais do fármaco.

A Figura 39 mostra os resultados dos experimentos de associação da AMIO + BZ, em diferentes doses, administrados por 20 dias consecutivos. Com relação a parasitemia, verificamos que assim como observado para camundongos tratados apenas com BZ (Figura 39A), a associação da AMIO (50mg/Kg/dia) ao BZ (100, 50 e 25mg/Kg/dia) foi capaz de suprimir completamente a presença de parasitos circulantes

no sangue, a partir do 4^º dpi. Esse efeito não havia sido observado com a administração apenas da AMIO (Figura 39A).

A mortalidade cumulativa observada foi de 100% para os camundongos não tratados (Figura 39B). Para os camundongos tratados com AMIO + BZ – 50mg/Kg/dia foi de 10% e para os tratados com AMIO e BZ – 25mg/Kg/dia foi de 20% aos 60 dpi. Os camundongos que receberam AMIO e BZ – 100mg/Kg/dia não apresentaram mortalidade durante o período de nossas observações (60dpi) (Figura 39B). A análise da sobrevivência revelou não haver diferença significativa entre os diferentes esquemas de tratamento empregados (Figura 39C; Tabela 7). De fato, a única diferença significativa observada foi em relação ao grupo não tratado, quando observamos um aumento de 25 dias (grupo NT) para 57-60 dias (grupos tratados com AMIO e/ou BZ) ($p < 0,0003$), ou seja, o tratamento protegeu os camundongos infectados da morte. Com relação a cura, foi possível observar uma atividade de 80% nos camundongos tratados com AMIO + BZ (100mg) e 40% nos tratados com AMIO + BZ (50mg). Para os tratados com AMIO + BZ (25mg) não houve cura parasitológica.

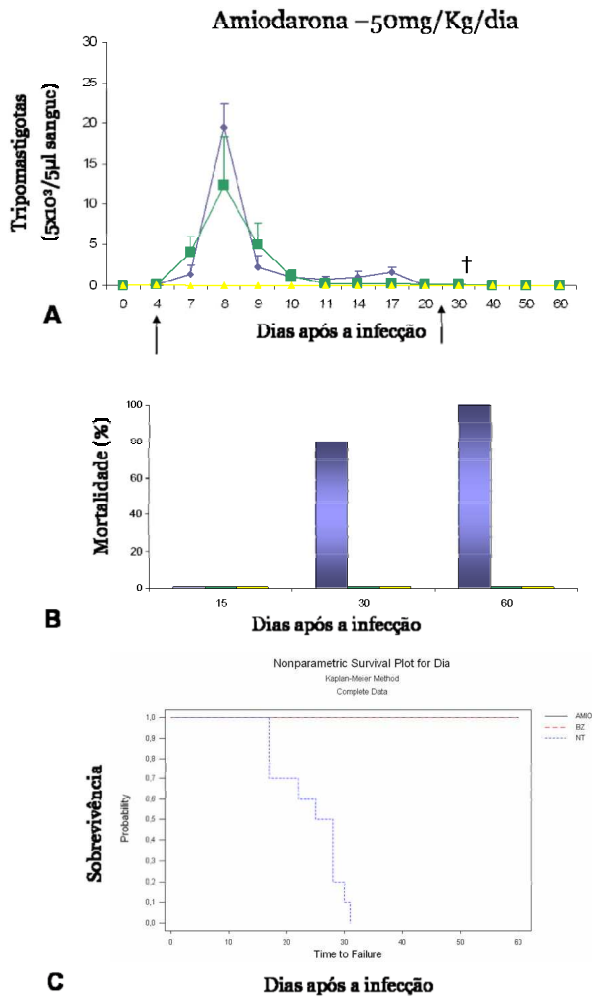


Figura 38: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com ■ Amiodarona, ■ Benznidazol e ■ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

Amiodarona (15mg/Kg/dia) e Benzonidazol (100, 50 e 25mg/Kg/dia)

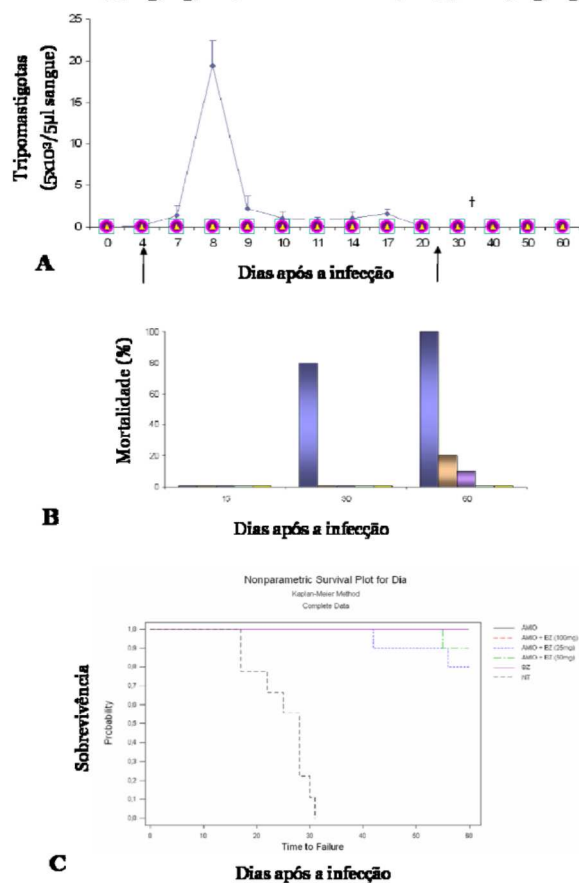


Figura 39: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com a associação Amiodarona e Benzonidazol – 100, 50 e 25mg/Kg/dia (associação), Benzonidazol e não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

5.5.2 Amiodarona e Ravuconazol

Uma possível alternativa para aumentar a eficácia do RAVU é utilizá-lo em associação com outros fármacos. Desse modo, realizamos ensaios de associação entre o RAVU e a AMIO. Como experimento controle, camundongos normais infectados com a cepa Y foram tratados com RAVU na dose 15mg/Kg/dia, por 20 dias.

Os camundongos tratados com RAVU apresentaram negatização da parasitemia após o 4^odpi, assim como o BZ, permanecendo nessa condição até o final de nossas observações (Figura 40A). Com relação à mortalidade, não observamos mortes entre os camundongos tratados com RAVU e BZ até os 60dpi (Figura 40B). A análise da sobrevivência (Figura 40C) revelou que assim como o BZ, o RAVU protege os camundongos da morte e aumenta a sobrevida em mais de 35 dias, quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,0001$). Igualmente, para os camundongos tratados com AMIO e RAVU em associação (Figura 41), não observamos parasitos circulantes após o início do tratamento aos 4^odpi. Também não houve mortalidade (Figura 41B) entre os camundongos tratados com os fármacos associados (Figura 41B) e a curva de sobrevivência revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com RAVU e AMIO e o grupo não tratado (Figura 41C e Tabela 7). Não houve diferença entre camundongos tratados com RAVU e AMIO em associação e os camundongos tratados com os fármacos isoladamente.

Após a avaliação da cura parasitológica, nas fases aguda e crônica da doença, observamos que houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,001$). Especialmente na fase crônica, esse aumento foi mais evidente, ainda quando comparado com camundongos não tratados ou tratados com os fármacos isoladamente (Tabela 7 e 8), chegando a atingir uma taxa de 60% de cura.

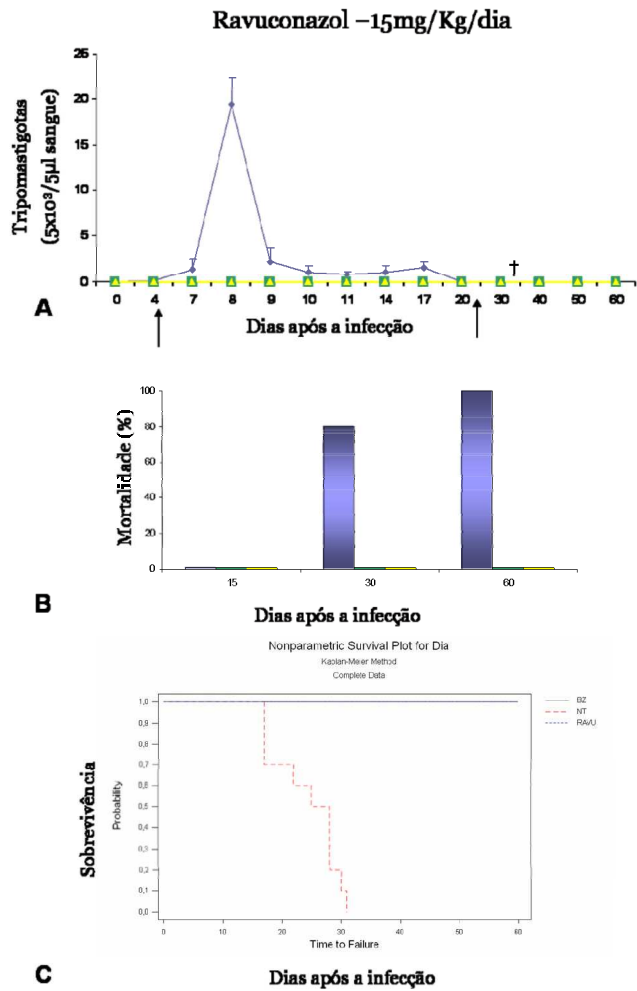


Figura 40: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos Swiss-Webster infectados com *T. cruzi* e tratados com █ Ravuconazol, █ Benzonidazol e █ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

Ravuconazol –15mg/Kg/dia e Amiodarona 50mg/Kg/dia (e.o.d.)

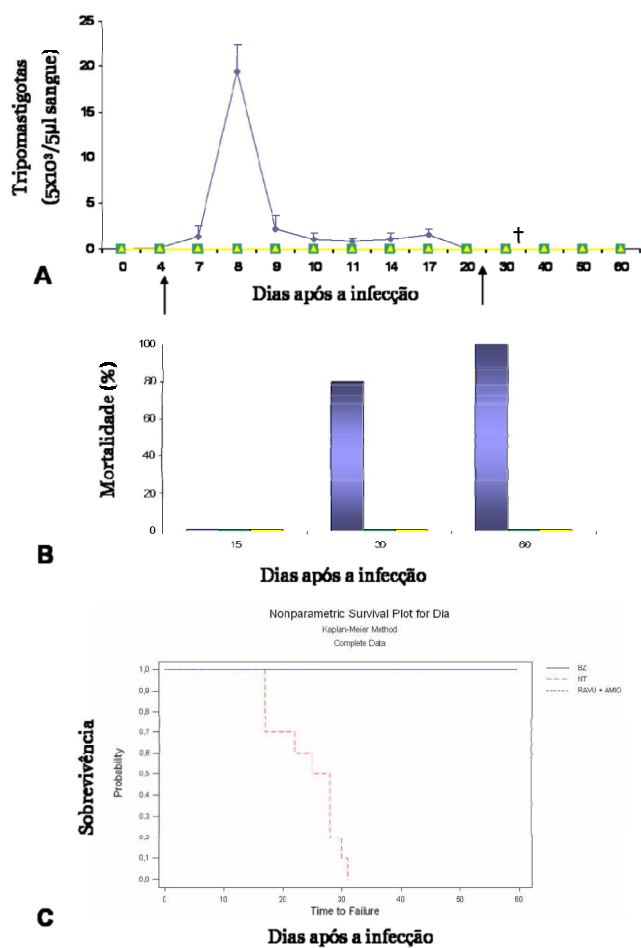


Figura 41: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com ■ Ravuconazol e Amiodarona (associação), ■ Benzonidazol e ■ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. As setas indicam o período de tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.

Tabela 9: Sobrevivência e cura parasitológica dos camundongos infectados com a cepa Y e submetidos a diferentes tratamentos durante a fase aguda da doença de Chagas.

GRUPO	Sobrevivência* (Tempo de sobrevivência médio, dias)	% Cura**
Não tratado (NT)	0/10 (0) (24 \bar{x} ,8)	0/10 (0)
Benzonidazol (BZ)	10/10 (100) (>60)	7/10 (70)
Tamoxifeno (TAM -10mg)	0/10 (0) (25 \bar{x} ,5)	0/10 (0)
Tamoxifeno (TAM – 25mg)	0/10 (0) (20 \bar{x} ,2)	0/10 (0)
Tamoxifeno (TAM – 50mg)	0/10 (0) (18 \bar{x} ,1)	0/10 (0)
Amiodarona (AMIO)	10/10 (100) (>60)	0/10 (0)
Ravuconazol (RAVU)	10/10 (100) (>60)	0/10 (0)
Ravuconazol e Amiodarona (RAVU + AMIO)	10/10 (100) (>60)	6/10 (60)
Amiodarona e BZ (100mg)	10/10 (100) (>60)	8/10 (80)
Amiodarona e BZ (50mg)	9/10 (90) (59 \bar{x} ,1)	4/10 (40)
Amiodarona e BZ (25mg)	8/10 (80) (58 \bar{x} ,8)	0/10 (0)

* - Proporção de camundongos que sobreviveram até 60 dias após a infecção;

** - Cura parasitológica determinada pela exame de sangue a fresco e hemocultura negativos

Podemos observar que a AMIO e o RAVU isolados ou em associação mostraram 100% de sobrevida aos 60 dpi. Contrariamente, o TAM em qualquer uma das doses não prolongou a sobrevida e não curou os camundongos. Como esperado para o BZ, 100% dos camundongos sobreviveram e 70% (7/10) foram curados (Tabela 7).

5.6 Teste de fármacos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas

Para avaliação da atividade *in vivo* dos fármacos, para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas, camundongos Swiss-Webster foram infectados com 50 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Após 120 dias de infecção, os camundongos sobreviventes foram distribuídos aleatoriamente e submetidos ao tratamento com as diferentes fármacos testados.

A Tabela 8 lista a mortalidade acumulada aos 180 dpi dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais. A maior mortalidade observada foi entre os camundongos tratados com BZ (30%), seguido pelos camundongos não tratados e tratados com RAVU. Aparentemente, a utilização dos fármacos em associação oferece uma maior proteção dos camundongos contra a morte.

Com relação a cura parasitológica, a associação do RAVU e AMIO mostrou resultados promissores. Um total de 60% dos camundongos tratado com os fármacos em associação apresentou resultados negativos na hemocultura e PCR. Esse resultado foi superior ao observado para os camundongos tratados com BZ (20%), e principalmente ao observado para os camundongos tratados com os fármacos isolados, que apresentaram 0% de cura (Tabela 6). Para os camundongos tratados com a associação AMIO e BZ não foi possível determinar a cura parasitológica, devido a impossibilidade da realização dos dois métodos definidos como critério de cura.

Tabela 10: Sobrevivência e cura parasitológica dos camundongos infectados com a cepa Y e submetidos a diferentes tratamentos durante a fase crônica da doença de Chagas.

GRUPO	Sobrevivência* (%)	% Cura**
Não tratado (NT)	80/10 (80)	0/10 (0)
Benzonidazol (BZ)	7/10 (70)	2/10 (20%)
Amiodarona (AMIO)	9/10 (90)	0/10 (0%)
Ravuconazol (RAVU)	8/10 (80)	0/10 (0%)
Ravuconazol e Amiodarona (RAVU + AMIO)	9/10 (90)	6/10 (60%)
Amiodarona e BZ (100mg)	9/10 (90)	N.D.
Amiodarona e BZ (50mg)	9/10 (90)	N.D.
Amiodarona e BZ (25mg)	9/10 (90)	N.D.

* - Proporção de camundongos que sobreviveram até 60 dias após o tratamento;

** - Cura parasitológica determinada pela exame de sangue a fresco, hemocultura negativos e PCR

N.D. – não determinado

C) Efeito cooperativo do sistema imune na eficácia do tratamento da doença de Chagas

5.7 Avaliação da cooperação dos linfócitos na atividade dos IBEs

5.7.1 Posaconazol

A média de parasitemia dos camundongos selvagens (WT), infectados com *T. cruzi*, não tratados ou tratados com POS ou BZ, está apresentada na Figura 42. Camundongos selvagens não tratados exibem parasitemia patente no 4ºdpi; a parasitemia alcança o pico no 9ºdpi e se torna indetectável no 16ºdpi. Camundongos tratados com POS e BZ tem parasitemia subpatente durante todo o período de observação. Todos os camundongos não tratados morreram até 28dpi (tempo médio de sobrevivência, 20,5±4,9 dias) (Figura 43A). Em contraste, todos os camundongos tratados sobreviveram ao período de observação (60dpi). A porcentagem de cura foi de

0% para os camundongos não tratados e de 86 e 89% para os camundongos tratados com BZ ou POS, respectivamente (Tabela 9). Houve diferença significativa na parasitemia, mortalidade e cura de camundongos tratados com BZ ou POS e camundongos não tratados ($p < 0.001$). Não foi observada diferença significativa entre camundongos tratados com POS ou BZ.

Camundongos LTCD4⁺KO foram altamente suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*. Os camundongos não tratados atingiram um pico de parasitemia níveis duas vezes superiores aos dos animais selvagens (Figura 42B). Todos morreram no 15ºdpi (Figura 43B). O tratamento com BZ ou POS manteve a parasitemia subpatente durante todo o tratamento (4-24º dpi). Entretanto, sete dias após o final do tratamento com BZ e 11 dias após o final do tratamento com POS a infecção foi reativada, com parasitos na corrente sanguínea de maneira intermitentemente, e persistindo durante o resto do período de observação (Figura 42B). Essa reativação foi intensa e associada com apenas 6% de sobrevivência aos 60 dpi para ambos os grupos de camundongos tratados (Figura 44B; sobrevida média foi de $53,7 \pm 6,6$ dias e $50,7 \pm 6,7$ dias para BZ e POS, respectivamente). Não houve diferença significativa na sobrevida entre os camundongos tratados ($p > 0,3$), mas ambos os grupos tiveram sobrevivência significativamente maior do que a dos camundongos não tratados ($p < 0,001$). Além disso, não foram observadas diferenças entre os camundongos LTCD4⁺KO tratados com POS ou BZ.

Camundongos LTCD8⁺KO infectados pelo *T. cruzi* e não tratados apresentaram um pico de parasitemia no 9ºdpi (Figura 42C), semelhante ao dos camundongos selvagens (Figura 42A), mas o tempo médio de sobrevida ($15,4 \pm 1,8$ dias, Figura 43C) foi significativamente menor do que para os animais selvagens (Figura 43A). Camundongos LTCD8⁺KO infectados pelo *T. cruzi* e tratados com BZ ou POS apresentaram parasitemia subpatente durante todo o período do tratamento (Figura 42C). Posteriormente, baixos níveis de parasitos circulantes foram observados 15 dias após o término do tratamento com BZ e 25 dias após o final do tratamento POS (Figura 42C). Essa reativação da infecção foi observada em 22% dos camundongos tratados com BZ e em 13% dos camundongos tratados com POS, e persistiu intermitentemente durante todo o resto do período de observação. As taxas de sobrevivência aos 60dpi foram de 0% para LTCD8⁺KO camundongos não tratados, 86% para os tratados com BZ, e 81% para os camundongos com POS (Fig. 43C e Quadro 1), com tempo médio de sobrevida de $58,8 \pm 3,0$ e $59,6 \pm 1,5$ dias para os tratados com BZ e POS, respectivamente. Ambos os grupos tratados apresentaram taxas de sobrevivência

significativamente maiores do que os dos camundongos não tratados ($p < 0,001$), mas não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência entre eles ($p > 0,5$). As taxas de cura de camundongos tratados LTCD8⁺KO foram 66% e 31% para os tratamentos com POS e BZ, respectivamente.

Camundongos LBKO infectados e não tratados apresentaram um pico de parasitemia, no 9^odpi (Figura 42D), semelhante ao dos camundongos não tratados (Figura 42A), mas com tempo médio de sobrevida ($15,3 \pm 0,78$ dias) significativamente menor (Tabela 9). Vinte e dois dias após o final do tratamento com BZ houve reativação da infecção (Figura 42D) em 56% dos camundongos, associada com a diminuição de sobrevivência, que atingiu 67% dos camundongos no final do período de observação (Figura 43D). Em contrapartida, não foi observada reativação da parasitemia para os camundongos LBKO tratados com o POS, o que foi associado com 100% de sobrevivência para esses animais (Figuras 42D e 43D). Houve uma diferença significativa na porcentagem de sobrevivência dos dois grupos de camundongos tratados comparados com os camundongos não tratados ($p < 0,001$, Tabela 9), mas também entre os camundongos tratados com POS e BZ ($p = 0,02$). A maior atividade do POS nestes animais também se refletiu na cura parasitológica, com taxa de 22% para os tratados com BZ e 71% para os tratados com POS (Tabela 9).

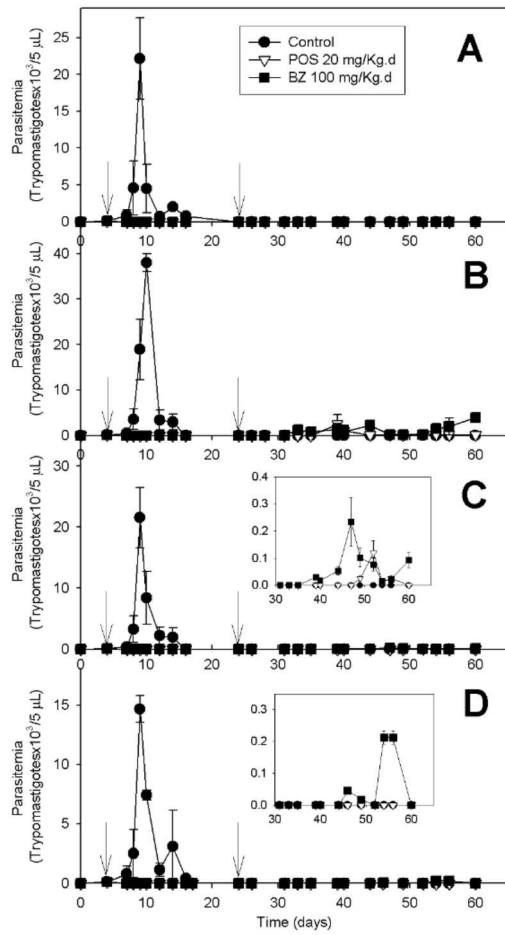


Figura 42: Parasitemia dos camundongos C57BL/6 (A), LTCD4⁺KO (B), LTCD8⁺KO (C) e LBKO (D), infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com Posaconazol ou Benzonidazol e não tratados. Círculos, não tratados; triângulos, tratados com POS; quadrados, tratados com BZ. As setas indicam o início e o fim do tratamento. Para maiores detalhes, ver Materiais e métodos.

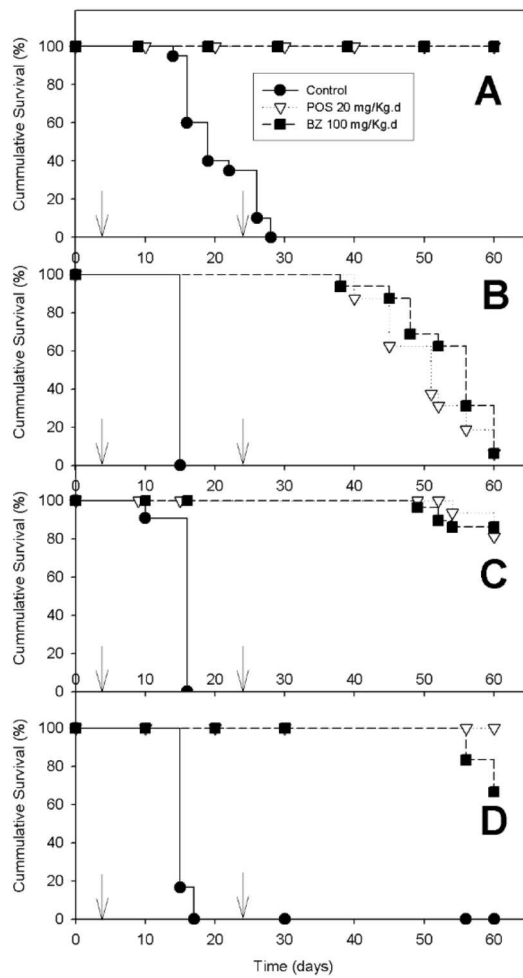


Figura 43: Sobrevivência dos camundongos C57BL/6 (A), LTCD4⁺KO (B), LTCD8⁺KO (C) e LBKO (D), infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com Posaconazol ou Benzimidazol e não tratados. Círculos, não tratados; triângulos, tratados com POS; quadrados, tratados com BZ. As setas indicam o início e o fim do tratamento. Para maiores detalhes, ver *Material e métodos*.

Tabela 11 – Cura parasitológica e taxa de sobrevivência dos camundongos WT e LT CD4⁺KO, LT CD8⁺KO e LBKO, infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com Posaconazol e Benznidazol.

Grupo	Tratamento					
	Não tratado		Benznidazol		Posaconazol	
	Sobrevivência (%) [*]	Cura ^{**}	Sobrevivência (%) [*]	Cura ^{**}	Sobrevivência (%) [*]	Cura ^{**}
	Tempo médio de sobrevivência (dias)	(%)	Tempo médio de sobrevivência (dias)	(%)	Tempo médio de sobrevivência (dias)	(%)
WT	0/20 (0)	0/20 (0)	29/29 (100)	25/29 (86)	18/18 (100)	16/18 (89)
	(20.5±4.9)		(>60)^{***}		(>60)^{***}	
LT CD4⁺ KO	0/15 (0)	0/15 (0)	1/16 (6)	0/16 (0)	1/16 (6)	0/16 (0)
	(15)		(53.7±6.6)		(50.5±6.6)	
LT CD8⁺ KO	0/11 (0)	0/11 (0)	25/29 (86)	19/29 (66)	13/16 (81)	5/16 (31)
	(15.4±1.8)		(58.8±3.0)		(59.6±1.5)	
LBKO	0/12 (0)	0/12 (0)	12/18 (67)	4/18 (22)	14/14 (100)	10/14 (71)
	(15.3±0.78)		(59.3±1.5)		(>60)	

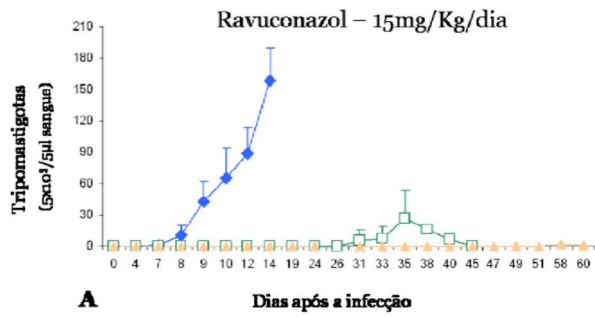
^{*} Proporção de camundongos que sobreviveram até 60 dpi. ^{**} Proporção de camundongos com parasitemia negativa no exame a fresco e hemocultura após a quimioterapia. ^{***} Resultado de sobrevivência foi calculado assumindo que o tempo de morte (falha) foi exatamente 60 dias. Esse dado subestima a verdadeira medida de sobrevivência quando o período de observação é limitado.

5.8 Avaliação do papel do interferon gama na atividade dos inibidores da biossíntese de ergosterol

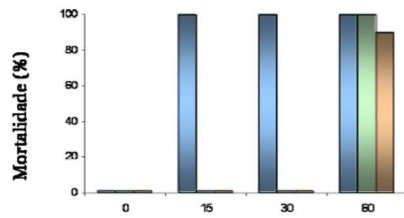
5.8.1 Ravuconazol

Dados da literatura já relataram a atividade do RAVU *in vitro* sobre o *T. cruzi* (Urbina e cols., 2003). Desse modo, avaliamos diretamente a atividade *in vivo*, em camundongos normais e imunodeficientes, para avaliarmos o papel do sistema imune do hospedeiro na atividade desse fármaco. Para isso, camundongos knockout para Interferon- γ (IFN- γ KO) foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e submetidos ao tratamento durante a fase aguda. Os camundongos IFN- γ KO infectados e não tratados (Figura 44A) apresentaram uma parasitemia elevadíssima, comparado aos camundongos selvagens que têm o sistema imune intacto. Os camundongos tratados com RAVU e BZ não apresentaram parasitos circulantes durante todo o período de tratamento. Entretanto, no 26^º dpi (2 dias após o término do tratamento) os camundongos tratados com BZ apresentaram reativação da infecção que durou até o 40^º dpi, com pico parasitêmico no 35^º dpi. Essa reativação atingiu 100% dos camundongos tratados. Entre os camundongos tratados com RAVU, a reativação foi observada no 30^º dpi, não sendo observado pico parasitêmico como nos camundongos tratados com BZ. Quando comparamos a curva de parasitemia dos dois grupos de camundongos tratados, vemos uma diferença significativa ($p < 0,05$), principalmente no 35^º dpi ($p < 0,0007$) sugerindo que os camundongos tratados com RAVU controlaram melhor a infecção.

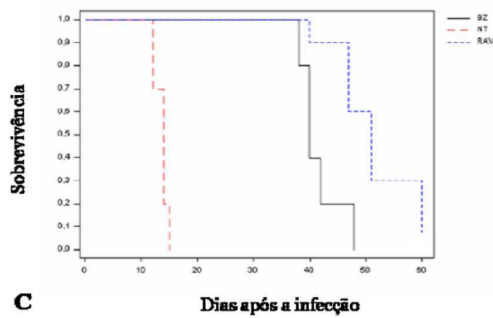
Camundongos não tratados sucumbiram rapidamente à infecção, apresentando mortalidade cumulativa de 100% aos 15dpi. Entre os tratados com BZ, a mortalidade foi de 100% aos 48dpi e para os tratados com RAVU de 90% aos 60 dpi (Figura 44B). Quando comparamos a curva de sobrevivência (Figura 44C), vemos que há diferença significativa entre os camundongos tratados e os não tratados ($p < 0,0003$). O tratamento com RAVU prolongou em média 10 dias a sobrevida dos camundongos quando comparado ao BZ. Com relação ao grupo NT, o RAVU prolongou a vida dos camundongos em 38 dias, apresentando diferença significativa ($p < 0,0001$). A cura parasitológica observada foi de 0% para camundongos não tratados e tratados com BZ. Para os tratados com RAVU, observamos 10% de cura.



A Dias após a infecção



B Dias após a infecção



C Dias após a infecção

Figura 44: Parasitemia (A), mortalidade cumulativa (B) e curva de sobrevivência (C) dos camundongos IFN- γ KO infectados com *T. cruzi* e tratados com ■ Ravuconazol, ■ Benzonidazol e ■ não tratados. † significa a morte de todos os camundongos do grupo. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver *Metodologia*.



6 D i s c u s s ã o



Apesar de passados 100 anos da descoberta da doença de Chagas ainda não existe um tratamento completamente efetivo, tornando-se necessário a busca de novas alternativas para a quimioterapia. Os medicamentos disponíveis atualmente, BZ e NFX, apesar de estarem em uso há cerca de 40 anos, são pouco conhecidos com relação ao mecanismo de ação e as bases moleculares da resistência do *T. cruzi*. O que já está estabelecido é que os nitroderivados são sintetizados como pró-drogas e passam por ativação enzimática dentro do patógeno para que tenham efeito citotóxico (revisto por Wilkinson et al., 2008). Além disso, sabe-se que esses medicamentos causam severos efeitos colaterais, causam resistência e possuem baixa eficácia, principalmente na fase crônica da doença.

Segundo Moran et al., (2009), dos 1556 medicamentos descobertos desde 1975, apenas 21 foram para doenças negligenciadas. No entanto, nenhum deles foi destinado ao tratamento da doença de Chagas. Do total de investimentos realizados no ano de 2007 para estudos sobre doenças negligenciadas (cerca de 2,5 bilhões de dólares) apenas 0,25% foram para doença de Chagas.

A fim de levar a total erradicação da transmissão da doença de Chagas no continente americano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lista temas de pesquisa prioritários, entre eles novos alvos de fármacos e vacinas. Para alcançar esse objetivo, uma estratégia racional é a busca de potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos, baseado em ferramentas moleculares, tais como a genômica e a proteômica. Através desses fundamentos, foram selecionados para esse estudo três diferentes enzimas a Tc52, a TcGluDH e a TcAKR.

Entre as enzimas que já foram descritas como capazes de interagir com os nitroderivados estão as enzimas do sistema antioxidante do *T. cruzi* (Maya et al., 1997). Na presença de oxigênio, essas enzimas mediam a redução de um elétron do nitro-grupo, gerando um radical nitro instável que leva a produção de superóxido, com subsequente regeneração do grupo parental (Docampo & Moreno et al., 1984). O principal sistema antioxidante do *T. cruzi* consiste de tiols que são reciclados pelas dissulfeto redutases, que no parasito são representadas por enzimas como a Tiol transferase (Tc52), tripanotiona redutase, superóxido dismutase, entre outras (Jockers-Scherübl et al., 1989; Ouaiissi et al., 1995; Prathalingham et al., 2007).

A Tc52 é uma tiol transferase, apresenta homologia estrutural com as Glutathione-S-transferases (GSTs) e tem sido relacionada entre os fatores cruciais para a sobrevivência e virulência do parasito (Allaoui et al., 1999). A resistência a fármacos mediado pelas GSTs

tem sido relatada em insetos, plantas, tumores e parasitos (revisto por Ouaiissi et al., 2002). Em *T. cruzi*, já foi demonstrado que a suscetibilidade de diferentes cepas é associada com níveis de glutatona conjugada e livre. A suscetibilidade do *T. cruzi* ao BZ e ao NFX pode inclusive ser aumentada pela redução da concentração de glutatona livre na cultura, pela adição de “buthionine sulfoximine” (Moncada et al., 1989; Repetto et al., 1996). Além disso, Maya et al., (1997) observaram diferença no nível de glutatona das cepas de *T. cruzi*, e que o tratamento com NFX e BZ reduziu os níveis de tióis livres.

Experimentos realizados por nosso grupo para seleção de genes diferencialmente expressos em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ revelaram a possível correlação da Tc52 com esse fenótipo no parasito (Murta et al., 2008). A expressão diferencial da Tc52 também foi observada por Mathieu-Daudé et al., (2007) em clones representativos de diferentes cepas. Os autores não correlacionaram a diferença de expressão com fatores filogenéticos, mas formularam a hipótese de que pode ter efeito sobre a proliferação, desenvolvimento e diferenciação do *T. cruzi*. Outras enzimas do sistema de defesa antioxidante já foram correlacionadas ao mecanismo de resistência do *T. cruzi* ao BZ. Murta et al., (2006) observaram a deleção de cópias do gene que codifica a “Old Yellow enzyme” de *T. cruzi* (TcOYE), assim como uma redução de aproximadamente sete vezes do nível de expressão da proteína em cepas com resistência ao BZ. Do mesmo modo, Nogueira et al., (2006) verificaram a superexpressão da enzima superóxido dismutase-A (TcSOD-A) em cepas com resistência ao BZ selecionada *in vitro*. Estudos funcionais com a enzima superóxido dismutase-B (TcSOD-B), demonstraram que parasitos deficientes deste gene são mais sensíveis ao NFX e ao BZ (Prathalingham et al., 2007).

No presente trabalho, nós não confirmamos a expressão diferencial da Tc52, em cepas sensíveis e resistentes ao BZ, pela metodologia de Western Blot utilizando anticorpos policlonais específicos anti-Tc52. A ausência de participação da Tc52 no mecanismo de resistência já havia sido sugerida por Allaoui et al., (1999) que utilizaram a transferência gênica para geração de mutantes com rompimento simples da Tc52 (+/-). Tais autores observaram que o rompimento monoalélico da Tc52 não teve efeito sobre a sensibilidade/resistência do *T. cruzi* ao BZ e ao NFX, sugerindo que a enzima sozinha não tenha um papel principal no metabolismo de fármacos tripanosomicidas.

De fato, nós observamos que provavelmente a resistência do *T. cruzi* aos nitroderivados pode ser determinada por um mecanismo independente da Tc52. A Tc52 poderia agir apenas como um fator de virulência e diferenciação do parasito (Garzón et al.,

2003). No entanto, como a Tc52 participa de um sistema complexo de defesa antioxidante, não podemos descartar a possibilidade do mecanismo de resistência ser um fenômeno multifatorial, mediado por um conjunto de enzimas do sistema antioxidante, e não apenas por uma única enzima.

Outra característica importante do *T. cruzi* é o fato de possuir um metabolismo amplamente baseado no consumo de aminoácidos, para o desenvolvimento de vias cruciais para a sobrevivência do parasito. Estudos dessas enzimas tem revelado novos alvos terapêuticos o que estimula o desenvolvimento de novos fármacos (Guimarães et al., 2008). No presente trabalho nós caracterizamos o gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase em 13 cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Murta et al., (2008) identificaram através da análise de microarray que o gene da TcGluDH é diferencialmente expresso em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Os autores observaram que o gene *TcGluDH* foi 2,6 vezes menos expresso na população resistente 17 LER quando comparado ao seu par sensível (17 WS). Já Andrade et al., (2008), realizando a análise proteômica de *T. cruzi* e verificaram um aumento de 2,6 vezes da expressão da proteína TcGluDH na população resistente BZR e no clone 27R, quando comparados aos seus pares sensíveis. Com objetivo de verificarmos esses achados, nós avaliamos a organização genômica, a expressão do mRNA e da proteína nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

Pelo ensaio de northern blot nós observamos dois transcritos, um de 2.2 e outro de 3.8 Kb. Provavelmente, esses dois transcritos correspondem as duas formas de GluDH observadas em *T. cruzi*, reconhecidos por nossa sonda específica devido ao fato de termos usado a seqüência completa para a hibridização. Desse modo, a sonda reconheceu ambas as formas que apresentam 97% de homologia na seqüência de nucleotídeos. A análise densitométrica do transcrito de 2.2 kb, que corresponde a TcGluGH-NADP⁺, que é o objeto desse estudo, demonstrou que houve redução no nível de mRNA nas cepas resistentes ao BZ. Essa redução também foi confirmada pelo ensaio de PCR quantitativo em Tempo Real.

Recentemente, a deleção de cópias de genes codificando duas nitrorredutases do tipo I a old yellow enzyme (TcOYE), também chamada de protaglandina sintase (Murta et al., 2006) e NTR-1 (Wilkinson et al., 2008), também foi associado à resistência *in vitro* do *T. cruzi* ao BZ e NFX. Rego et al., (2007) analisando outra enzima do metabolismo de aminoácidos, a Tirosina Aminotransferase (TcTAT) verificaram um aumento no nível de transcrição do mRNA nas cepas de *T. cruzi* resistentes ao BZ, comparado ao par sensível.

No entanto, essa diferença não se traduz na expressão da proteína. Aqui, nós observamos que TcGluDH apresenta redução na expressão do nível de proteínas em cepas do *T. cruzi* resistentes ao BZ, demonstrado pela técnica de Western blot, com redução em cepas com resistência *in vitro* e *in vivo*.

Nossos resultados confirmam os dados da literatura que descrevem a presença de múltiplas cópias para o gene da TcGluDH, não arranjadas em tandem (Barderi e cols., 1998). No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre a organização genômica e o fenótipo de resistência ao BZ, sendo apenas observada uma variação zimodema-específica.

A participação das GluDHs de parasitos no mecanismo de resistência a fármacos, é pouco relatada na literatura. Uzcategui et al., (2005) avaliaram a preferência de substratos e a utilização da glicose em parasitos de cultura do gênero *Leishmania*, resistentes ao composto glibenclâmida. Os autores observaram que parasitos resistentes apresentaram um aumento de 17% da atividade da GluDH durante a fase exponencial de crescimento e de 378% na fase estacionária, quando comparados aos parasitos sensíveis. Os autores sugerem que o aumento da GluDH está relacionado ao seu papel na incorporação de metabólitos derivados de aminoácidos dentro do Ciclo de Krebs. Em *Leishmania*, sabe-se que a resistência a glibenclâmida está relacionada à modulação de vias metabólicas.

Nossos resultados estão de acordo com Murta e cols., (2008), que verificaram a redução nos níveis de mRNA do gene TcGluDH. No entanto, não observamos o aumento na expressão da proteína descrita por Andrade et al., (2008) na cepa com resistência selecionada *in vivo* (BZR). Esse resultado, provavelmente, deve-se a uma variação nas técnicas. Espera-se que o Western Blot seja mais sensível que a análise proteômica por eletroforese em gel bidimensional, já que utiliza anticorpos específicos para reconhecer a proteína. Também é importante considerar que o *T. cruzi* apresenta duas diferentes formas de GluDH, e que provavelmente a proteína identificada por Andrade e cols., (2008) não seja a GluDH-NADP+, foco deste estudo. De qualquer modo, investigações complementares devem ser feitas para resolver essa questão.

Além da caracterização da Tc52 e da TcGluDH, no presente trabalho nós caracterizamos uma TcAKR de *T. cruzi*. As AKRs são enzimas envolvidas na conversão de aldeídos e cetonas para álcoois primários e secundários. Relatos na literatura associaram as AKRs com o mecanismo de resistência a fármacos anti-câncer (Wsol et al., 2007; Jin & Penning, 2007). Novotna et al., (2008) mostraram que a AKR1C3, membro da superfamília Aldo/ceto redutase foi capaz de inativar a oracina, um potente composto em

triagem para o tratamento de câncer. Devido ao fato das AKRs serem superexpressas em tumores malignos de próstata e mama, os autores sugerem que o desenvolvimento de inibidores da AKR1C3 pode aumentar a eficácia do tratamento.

No presente trabalho, nós analisamos o nível de mRNA da TcAKR, assim como o perfil de restrição através do Southern blot. No entanto, não foi possível caracterizar o nível de expressão da TcAKR, devido a falha na expressão da proteína recombinante. Alguns problemas técnicos comuns podem impedir a expressão eficiente de proteínas recombinantes tais como o códon de uso, estabilidade da proteína, condições fisiológicas da célula, condições de expressão e formação de corpúsculos de inclusão (Sorensen & Mortensen, 2005). Apesar de diversas tentativas, com modificação das principais variáveis envolvidas na expressão, não foi possível concluir a caracterização da TcAKR, e estabelecer relação com o mecanismo de resistência ao BZ. Ainda assim, os dados obtidos são de grande importância por representarem a primeira caracterização molecular da TcAKR de *T. cruzi*. Considerando que uma outra oxirredutase, a Álcool desidrogenase (TcADH), já foi correlacionada ao mecanismo de resistência do *T. cruzi* ao BZ *in vitro* (Campos et al., 2009), não podemos descartar também o envolvimento da TcAKR.

De modo geral outros fatores podem ser determinantes da resistência do *T. cruzi* a BZ. Recentemente, Wilkinson et al., (2008) identificaram uma Nitroredutase do tipo I (NTRI) em *T. cruzi* e *T. brucei* e demonstraram o envolvimento dessa enzima no fenótipo de resistência dos tripanosomas ao NFX e a outros nitroderivados. A NTRI, anteriormente descrita apenas para bactérias, contém o FMN como co-fator e funciona através da redução de dois elétrons do grupo nitro, levando a modificações que promovem o dano do DNA, de maneira independente do oxigênio e seus metabólitos.

Sendo assim, acreditamos que um estudo mais amplo, envolvendo diversas enzimas deva ser realizado, na tentativa de estabelecer um modelo para a resistência do *T. cruzi* ao BZ e ao NFX, sem deixar de considerar também a interação entre fatores do parasito, do hospedeiro e de seu sistema imunológico. A identificação e caracterização de moléculas diferencialmente expressas pode constituir uma maneira de se entender os mecanismos de resistência do *T. cruzi* e posteriormente orientar o desenho de inibidores.

Uma outra linha desenvolvida nesse trabalho foi o teste de fármacos disponíveis para outros fins, mas que atuem sobre alvos moleculares do *T. cruzi*. Foram escolhidos para teste os fármacos Tamoxifeno (TAM) e Amiodarona (AMIO), além do Ravuconazol (RAVU). Essa abordagem pode possibilitar uma redução nos custos e tempo de pesquisa

sobre a toxicidade, uma vez que os fármacos disponíveis para o consumo humano já passaram por essa etapa de avaliação anteriormente.

Evidências da literatura indicam uma grande capacidade do TAM em agir contra potenciais alvos moleculares do *T. cruzi*. Desse modo, nós testamos a atividade *in vitro* e *in vivo* do TAM sobre o *T. cruzi*. Nossos resultados mostraram um significativo efeito *in vitro* do TAM sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. No entanto, essa mesma eficácia não foi observada *in vivo*.

O modelo experimental utilizado é suscetível a doença de Chagas. Camundongos Swiss-Webster infectados pela cepa Y e não tratados, apresentam pico parasitário elevado em torno do oitavo dia e alta mortalidade até 30 dias após a infecção (Romanha et al., 2002). No entanto, nós temos observado que o tratamento com fármacos tripanosomicidas como BZ, Nifurtimox e Posaconazol levam ao controle total da parasitemia e aumentam significativamente a sobrevida dos animais tratados. Infelizmente, o mesmo efeito tripanosomicida não foi observado no tratamento de camundongos com diferentes doses de TAM (10-50mg/Kg/dia). Além disso, os camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados com TAM sofreram uma redução na sobrevida, apresentando sinais clínicos relevantes tais como emagrecimento, hipotermia e diarreia.

Para a doença de Chagas já foi demonstrado anteriormente que a administração de hormônios sexuais leva a modulação da resposta imune, o que pode alterar o curso da doença (Prado et al., 1999; Souza et al., 2001). Isso ocorre devido a forte relação existente entre o sistema imunológico e o sistema endócrino. Um exemplo disso, são os receptores de estrogênio que são expressos em várias células do tecido linfóide, assim como em linfócitos e macrófagos circulantes (Klein, 2000). Souza e cols., (2001) observaram que camundongos fêmeas estereotomizadas e infectadas pelo *T. cruzi* apresentam alta parasitemia e mortalidade quando comparadas ao grupo controle. Segundo os autores, isso se deve a interferência dos níveis de estrogênio sobre o desenvolvimento da doença, levando a imunossupressão da resposta imune protetora. Do mesmo modo, no presente trabalho, a alteração nos níveis de estrogênio gerada pela administração de TAM pode ter aumentado a suscetibilidade do nosso grupo experimental.

O papel dos hormônios sexuais varia de acordo com a relação parasito-hospedeiro, sendo que em alguns casos observa-se o efeito benéfico (Klein, 2000). Recentemente, foi demonstrada a atividade *in vivo* do TAM sobre *Leishmania amazonensis*. Camundongos BALB/c foram tratados por 15 dias consecutivos com TAM (20mg/Kg/dia) por via intraperitoneal, havendo redução no tamanho da lesão e no parasitismo tecidual (Miguel e

cols., 2008 e 2009). A diferença na atividade obtida em camundongos infectados por *Leishmania* e a que nós observamos, pode ser devido a via de administração, uma vez que a via intraperitoneal aumenta consideravelmente a resposta ao tratamento. Outra hipótese, é que a modulação do sistema imune resultante do tratamento com TAM, tenha favorecido o controle da infecção nos camundongos infectados por *Leishmania*. Em camundongos fêmeas infectados com *Taenia crassipeps* a administração de TAM reduziu em 80% a carga parasitária; nos machos a redução foi menor atingindo 50%. Esse efeito foi relacionado em ambos os sexos ao aumento dos níveis de mRNA da interleucina (IL)-2 (uma citocina associada a proteção na cisticercose murina) e da IL-4, havendo uma repressão da resposta T-helper (TH) 1 e facilitação da resposta TH2 (Vargas-Villavicencio et al., 2007). Para o *T. cruzi* já foi demonstrado que citocinas como a IL-4 proporcionam um aumento na suscetibilidade, devido a um intenso parasitismo e supressão da síntese de interferon gama (IFN- γ) (Abrahamsohn et al., 2000).

Compostos anti-câncer já vem sendo utilizados com algum sucesso em testes quimioterápicos para a doença de Chagas (Kinnamon et al., 1998). Nossos resultados mostraram que o TAM apresenta uma grande capacidade de agir sobre o *T. cruzi in vitro*. No entanto, nós não observamos uma correlação entre a grande atividade *in vitro* e sua atividade *in vivo*, devendo a causa dessa discrepância ser melhor avaliada. Outra possibilidade é explorar a possibilidade de alteração da estrutura do TAM, adaptando-o para que tenha um melhor desempenho.

Outro fármaco testado foi a AMIO, um antiarrítmico usado para o tratamento das complicações cardíacas na fase crônica da doença de Chagas. Alguns autores comprovaram a atividade antifúngica da AMIO (Afeltra et al., 2004; Gupta et al., 2007). Para a doença de Chagas, a primeira evidência experimental de atividade tripanosomicida foi mostrada por Benaim e cols., (2006). Paniz-Mondolfi et al., (2008) mostraram o efeito benéfico da administração de AMIO em paciente com co-infecção por *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*. Aqui, nós verificamos que a AMIO, quando administrada sozinha, foi capaz de prolongar a sobrevivência de camundongos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas, no entanto, sem efeito sobre a cura parasitológica.

Uma outra alternativa a ser considerada é a associação de fármacos, porque além de haver uma potencialização do efeito curativo, pode-se reduzir as doses finais utilizadas. Assim sendo, fármacos que causem efeitos colaterais podem ser administrados em associação a outros fármacos, em menor dose, com conseqüente redução da toxicidade sobre o hospedeiro. Essa estratégia já tem sido utilizada com sucesso para diversas doenças

tais como Leishmaniose (Chunge et al., 1985), Malária (Moore et al., 2009) e SIDA (Rosenthal, 1995). Nos casos em que o uso isolado não possibilita os resultados esperados, a triagem clínica de compostos em associação pode aumentar a eficácia terapêutica.

Em vista dos resultados anteriores sobre a atividade tripanosomicida da AMIO, nós avaliamos o efeito da AMIO em associação com outros fármacos. Quando administrada em associação com o RAVU houve um aumento da atividade, levando a cura de 60% dos camundongos analisados. Esses dados associados aos resultados dos testes *in vitro* e evidências da literatura, indicam a potencial atividade da AMIO no tratamento da doença de Chagas, e corroboram os achados de Benaim e cols. (2006) sobre a associação de AMIO a um inibidor da biossíntese de ergosterol, o Posaconazol. Nesse trabalho os autores mostraram o aumento da cura parasitológica em camundongos tratados com AMIO e Posaconazol em associação, quando comparado aos camundongos não tratados e tratados com os fármacos isoladamente.

Seguindo a linha de associação de fármacos, nós avaliamos o efeito da associação da AMIO com o BZ em diferentes doses (25, 50 e 100mg/Kg/dia). A combinação desses fármacos proporcionou um controle da parasitemia, provavelmente devido a atividade do BZ, uma vez que camundongos tratados apenas com AMIO apresentam parasitos persistentes durante todo o período. Como esperado, camundongos tratados com AMIO + BZ (100mg) apresentaram alta taxa de cura, semelhante ao grupo controle tratado apenas com BZ. A associação utilizando BZ (50mg) reduziu a metade essa taxa de cura. Desse modo, verificamos que não houve efeito sinérgico ou aditivo nessa associação, ao contrário do observado com o RAVU, inibidor da biossíntese de ergosterol. Araújo e cols., (2000) avaliaram a eficácia do tratamento de camundongos com a associação BZ e o inibidor da biossíntese de ergosterol Cetoconazol. A associação desses fármacos aumentou significativamente a taxa de cura, quando comparado aos camundongos tratados com os fármacos isolados. Aqui, nós verificamos que a associação com maior potencial foi a da AMIO com o RAVU, indicando que os inibidores da biossíntese de ergosterol são de fato os candidatos racionais a quimioterapia da doença de Chagas.


Além da baixa eficácia dos fármacos, a questão de cooperação do sistema imune na eficácia da quimioterapia é outro fator limitante do tratamento da doença de Chagas. Como a eficácia do BZ depende comprovadamente da cooperação do sistema imune do hospedeiro, isto poderia representar uma limitação do uso desse fármaco, principalmente no tratamento da pacientes chagásicos imunodeficientes ou imunossuprimidos. No entanto, vários estudos clínicos têm demonstrado que o BZ mantém significativa atividade anti-*T.*

cruzi nesses pacientes, embora não tenham sido relatada cura parasitológica (Solari et al., 1993; Ferreira et al., 1997; Sartori et al., 1998). Assim, um dos objetivos específicos para um tratamento ideal da doença de Chagas é a capacidade do fármaco em manter a sua atividade, mesmo quando o hospedeiro é imunossuprimido (Ribeiro et al., 2009). Esta possibilidade já foi sugerida para POS (Molina et al., 2000; Urbina & Docampo, 2003). O tratamento com POS de camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ revelou atividade tripanosomicida semelhante ao observado em camundongos não-imunossuprimidos (Molina et al., 2000). Além disso, a taxa de cura pelo POS foi mais elevada do que aquela obtida pelo tratamento com o BZ no mesmo modelo experimental. Mais recentemente, nós demonstramos que a atividade anti-*T. cruzi* do POS é menos dependente do interferon- γ do que o BZ (Ferraz et al., 2007).

Os resultados do presente trabalho confirmam que ambos os fármacos POS e BZ são muito efetivas no aumento da sobrevivência e indução da cura parasitológica em camundongos C57BL/6, infectados pelo *T. cruzi*, mas também demonstra uma redução na atividade tripanosomicida em camundongos knockouts. O grupo C57Bl/6 (WT) apresentou diferença significativa entre os camundongos tratados e não tratados com relação à taxa de cura. Isso mostra que ambos os fármacos, POS e BZ, são potentes para o tratamento da fase aguda em camundongos C57Bl/6.

Camundongos LTCD4⁺KO infectados pelo *T. cruzi* apresentaram alta suscetibilidade à infecção, com aumento da parasitemia e mortalidade, quando comparados aos camundongos selvagens C57BL/6 (WT). Os camundongos tratados com BZ e POS apresentaram 100% de reativação da infecção, poucos dias após o término do tratamento. A mortalidade dos camundongos tratados também foi elevada, sendo que nos camundongos não tratados foi precoce, com 100% já aos 15dpi. A essencialidade dos LTCD4⁺ provavelmente está relacionada às funções desempenhadas por este linfócito tais como ativação dos LTCD8⁺, estímulo da produção de anticorpos e liberação de citocinas importantes, como o IFN- γ (Brenner & Gazzinelli, 1997). Na ausência dos LTCD4⁺ todas essas atividades estariam deficientes, o que tornaria o hospedeiro mais suscetível. Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores (Rottenberg et al., 1993 e 1995), que observaram aumento da parasitemia e da mortalidade em camundongos deficientes de LTCD4⁺. Apesar de não ter sido observado pico parasitêmico elevado após a reativação, houve alta mortalidade nos camundongos LTCD4⁺KO. Alguns trabalhos sugerem que a deficiência deste componente imunológico causaria redução da resposta imune do

hospedeiro, implicando no aumento do parasitismo tecidual (Rottenberg et al., 1993; Tarleton et al., 1995; Rottenberg et al., 1995; Tarleton, 1996; Gonçalves da Costa et al., 2002). Tanto o BZ quanto o POS falharam em curar camundongos LTCD4⁺KO infectados pelo *T. cruzi*. A dependência dos LTCD4⁺ é muito preocupante nos casos de pacientes chagásicos que apresentam co-infecção pelo HIV, haja vista a deficiência apresentada por estes indivíduos.

Os camundongos LTCD8⁺KO foram mais resistentes à infecção do que os camundongos LTCD4⁺KO. Os camundongos não tratados apresentaram parasitemia semelhante à do grupo controle normal. A mortalidade entre os camundongos não tratados foi elevada, conforme o observado para os outros grupos de camundongos knockouts. Alguns autores (Tarleton et al., 1992) demonstraram que camundongos deficientes na proteína  microglobulina apresentam alta parasitemia e morrem precocemente devido à resposta inflamatória deficiente, quando comparados a camundongos normais. Entre os camundongos tratados houve baixa taxa de reativação da infecção pós-tratamento e mortalidade, quando comparados aos camundongos LTCD4⁺KO.

A eficácia de ambos os tratamentos no aumento da sobrevivência de camundongos LTCD8⁺KO pode indicar importantes contribuições de outros componentes do sistema imune adaptativo no controle das fases iniciais da infecção, especialmente durante o tratamento BZ. Neste caso, LTCD8⁺ são provavelmente mais necessários durante fases posteriores da infecção. A cura da doença de Chagas pelo BZ durante a fase crônica foi recentemente associado à presença de uma população estável LTCD8⁺, que apresenta características de células centrais de memória (Bustamante et al., 2008). Esta população é antígeno-independente, resultando em forte proteção, mesmo contra um novo desafio. Em contrapartida, houve um grande declínio nos níveis LTCD4⁺ após o tratamento durante a fase crônica, o que demonstra que esta população se degrada mais rápido. Outras investigações mostraram também que o tratamento com BZ aumenta a resposta com LTCD8⁺, construindo-se a resistência à reinfecção (Olivieri et al., 2002). No entanto, a presença de células funcionais LTCD8⁺ parece ser fundamental para a erradicação de parasitas nos camundongos tratados com o POS. A maior dependência do POS da presença de linfócitos LTCD8⁺ pode refletir a sua atividade específica contra os estágios intracelulares (amastigotas), que exigem a biossíntese *de novo* de ergosterol para a sobrevivência e proliferação e sofrem a ação citolítica das células LTCD8⁺.

Os LB são considerados importantes elementos de defesa do hospedeiro para o controle da infecção, devido à característica ativação policlonal e hipergamaglobulinemia

que ocorrem na fase aguda, auxiliando na remoção dos parasitos circulantes. Por outro lado, a resposta desencadeada pelos LB na fase aguda no geral tem caráter inespecífico, com altos títulos de imunoglobulinas (IgM, IgG1 e IgG3) (Brener & Gazzinelli, 1997). Os camundongos LBKO não tratados apresentaram parasitemia semelhante a observada nos camundongos normais. O POS mostrou-se mais eficiente no controle da parasitemia, mortalidade e cura dos camundongos LBKO. Essa maior dependência dos LB entre os camundongos infectados e tratados com BZ, pode estar relacionado ao seu mecanismo de ação. O BZ poderia estimular a exposição de sítios específicos do parasito, que induziriam uma resposta imune mediada pelas células B. Essa hipótese foi sugerida anteriormente quando observou-se um aumento da fagocitose dos macrófagos de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com BZ (Lages-Silva et al., 1990). Além disso, o BZ pode preferencialmente atuar sobre formas extracelulares (tripomastigota) do parasito, que são alvos da resposta imunológica mediada por anticorpos, enquanto o POS atua também sobre a forma amastigota, que normalmente não são suscetíveis a anticorpos devido à sua localização intracelular.

Os LTCD4⁺ foram os elementos do sistema imune que mais influenciaram a atividade do BZ e do POS. Provavelmente, isso seja devido ao mecanismo ativador/efetor desempenhado por esta célula na resposta celular, a principal fonte de combate aos parasitos intracelulares. Já os LT CD8⁺ foram mais importantes para os camundongos tratados com POS e os LB para os tratados com BZ. O POS e o BZ apresentaram eficácias diferentes nos camundongos knockouts, sugerindo que tenham mecanismos de ação contra o parasito e de cooperação com o sistema imune distintos. Torna-se evidente que os linfócitos T e B apresentam um papel importante na resposta imunológica e na eficácia do BZ e POS.

Enquanto para o POS nós avaliamos o efeito da ausência dos linfócitos, na eficácia do tratamento, para o RAVU nós avaliamos o efeito da ausência da citocina interferon gama. Como o RAVU é um inibidor da biossíntese de ergosterol (IBE), resolvemos analisar se este fármaco seria capaz de atuar em camundongos com o sistema imune deficiente, assim como já havíamos demonstramos para outro IBE, o Posaconazol (Ferraz e cols., 2007). Escolhemos camundongos IFN- γ KO porque foi demonstrado anteriormente que o IFN- γ tem relação direta com a eficácia do tratamento clínico e experimental da doença de Chagas. A mutação no gene do IFN- γ homozigótica, está localizada no cromossomo 10 e causa redução na função de macrófagos durante a infecção, através da

redução de produtos microbianos e redução na expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade II (MHC II). Além disso, observa-se redução na atividade das células *Natural Killers* (Dalton e cols., 1993).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a atividade tripanosomicida do RAVU e BZ é reduzida em camundongos IFN- γ . Vários trabalhos enfatizam a importância do IFN- γ na resistência a infecção pelo *T. cruzi*. Essa citocina também foi relacionada à resposta ao tratamento com BZ em modelos murinos (Michaylowsky et al., 1998; Romanha et al., 2002) e humanos (Bahia-Oliveira et al., 2000). O IFN- γ apresenta um papel fundamental na resistência natural a infecção pelo *T. cruzi* através da ativação de macrófagos que direcionam a diferenciação das células T (Torrice et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992; Seder et al., 1993; Brener & Gazzinelli, 1997). Nesse trabalho nós observamos que camundongos IFN- γ não tratados são altamente suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* quando comparados aos camundongos selvagens C57Bl/6, confirmando resultados prévios (Michailowsky et al., 2001). Embora nossas observações indiquem que os camundongos IFN- γ tratados com ambos os fármacos foram hábeis para suprimir a parasitemia durante o período de tratamento, houve reativação após o término de administração do fármaco. Esse resultado indica uma atividade tripanostática mais do que uma atividade tripanosomicida, nessas condições experimentais. No entanto, a reativação foi mais severa nos camundongos tratados com BZ, do que nos camundongos tratados com RAVU, que apresentaram níveis de parasitos inferiores. No entanto, ambos os fármacos apresentaram resultados semelhantes de sobrevivência e cura, com baixos níveis nos dois grupos tratados. De maneira semelhante, nós havíamos mostrado anteriormente a importância do IFN- γ no tratamento de camundongos com POS ou BZ (Ferraz et al., 2007).

Assim como para o POS, o tratamento com RAVU e BZ não é determinado apenas pelo efeito direto do fármaco, mas também pelo efeito cooperativo com o sistema imune do hospedeiro. A reativação de infecções subpatentes em pacientes imunodeficientes em consequência de doenças secundárias e outras condições clínicas tem sido reportada freqüentemente (Galhardo et al., 1999; Madalosso et al., 2004). Desse modo é fundamental a busca de alternativas para o tratamento nessas situações.

Muitos são os desafios para o estabelecimento de uma nova alternativa para o tratamento da doença de Chagas, principalmente pelo fato desta ser uma doença negligenciada. Apesar do sucesso nas atividades de controle da transmissão vetorial, milhares de pessoas vivem ainda sem perspectivas de tratamento. Além disso, tem sido

registrado um aumento no número de casos em áreas consideradas não-endêmicas, como a América do Norte, alguns países da Europa e a própria região amazônica (Rassi et al., 2009). Desse modo, a busca racional de novos alvos e novos fármacos deve prosseguir, a fim de garantir melhor qualidade de vida aos portadores dessa enfermidade, que há 100 anos persiste em nosso meio sem cura. O presente trabalho, apresenta dados experimentais de novas alternativas para a quimioterapia da doença de Chagas, e abre perspectivas para serem exploradas futuramente.

7 C onclusões

O presente trabalho de tese, nos permite concluir:

- 1) Não há correlação entre a expressão da Tc52 e o fenótipo de resistência ao Benzonidazol em *T. cruzi*;
- 2) Houve uma relação entre a redução do nível de mRNA e de expressão da TcGluDH e resistência ao Benzonidazol; no entanto, não foi observada diferença na organização do gene.
- 3) A TcAKR foi parcialmente caracterizada, e pela primeira vez foi demonstrado o nível de expressão e a sua organização genômica nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol.
- 4) Não foi possível expressar a proteína TcAKR recombinante, provavelmente devido a incompatibilidade do sistema heterólogo de expressão utilizado;
- 5) O Tamoxifeno apresentou uma grande atividade *in vitro* contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Resultados semelhantes não foram observados nos testes *in vivo*;
- 6) A Amiodarona utilizada isoladamente aumentou a sobrevivência dos camundongos, sem proporcionar cura parasitológica nas fases aguda e crônica;
- 7) A associação do Ravuconazol com a Amiodarona aumentou significativamente a cura, comparado com os camundongos não tratados e tratados com os fármacos isoladamente, principalmente na fase crônica;
- 8) Não observamos efeitos sinérgicos ou aditivos na associação da Amiodarona com o Benzonidazol em diferentes doses;
- 9) Os LTCD4⁺ foram os elementos do sistema imune que mais influenciaram a atividade do Benzonidazol e do Posaconazol. Os LTCD8⁺ foram mais importantes para os camundongos tratados com Posaconazol e os LB para os tratados com Benzonidazol.
- 10) O POS e o BZ apresentaram eficácias diferentes nos camundongos knockout, sugerindo que tenham mecanismos de ação contra o parasito e uma cooperação com o sistema imune distintos. Torna-se evidente que os linfócitos T e B apresentam um papel importante na resposta imunológica e na eficácia do BZ e POS.
- 11) O Ravuconazol foi dependente de IFN- γ assim como o BZ, demonstrando que essa citocina é primordial para a eficácia do tratamento da doença de Chagas, com ambas as drogas.

8 Anexos

Absence of CD4⁺ T Lymphocytes, CD8⁺ T Lymphocytes, or B Lymphocytes Has Different Effects on the Efficacy of Posaconazole and Benzimidazole in Treatment of Experimental Acute *Trypanosoma cruzi* Infection[†]

Marcela L. Ferraz,¹ Ricardo T. Gazzinelli,^{2,3} Rosana O. Alves,¹
 Julio A. Urbina,⁴ and Alvaro J. Romanha^{1*}

Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular¹ and Laboratório de Imunopatologia,² Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ, 30.190-362, Belo Horizonte, MG, Brazil; Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG, 30.170-010, Belo Horizonte, MG, Brazil³; and Laboratório de Química Biológica, Centro de Síntese e Biologia, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827, Caracas 1020, Venezuela⁴

Received 13 June 2008/Returned for modification 10 September 2008/Accepted 2 November 2008

We investigated the influence of CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, and B lymphocytes on the efficacy of posaconazole (POS) and the reference drug benzimidazole (BZ) during treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in a murine model. Wild-type mice infected with *T. cruzi* and treated with POS or BZ presented no parasitemia, 100% survival, and 86 to 89% cure rates, defined as the percentages of animals with negative homocultures at the end of the observation period. CD4⁺-T-lymphocyte-knockout (KO) mice infected with *T. cruzi* and treated with BZ or POS controlled parasitemia during treatment, although circulating parasites reappeared after drug pressure cessation, leading to only a 6% survival rate and no cure. CD8⁺-T-lymphocyte-KO mice infected with *T. cruzi* and treated with POS or BZ had intermediate results, displaying discrete parasitemia after the treatment was ended, 81 and 86% survival, and cure rates of 31 and 66%, respectively. B-lymphocyte-KO mice infected with *T. cruzi* and treated with BZ relapsed with parasitemia 1 week after the end of treatment and had a 67% survival rate and only a 22% cure rate. In contrast, the activity of POS was much less affected in these animals, with permanent suppression of parasitemia, 100% survival, and a 71% cure rate. Our results demonstrate that abrogation of different lymphocytes' activities has distinct effects on the efficacy of POS and BZ in this experimental model, probably reflecting different parasite stages preferentially targeted by the two drugs and distinct cooperation patterns with the host immune system.

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 10 to 15 million inhabitants in Latin America (33, 45). Substantial advances in controlling this disease have been made by combating the triatomid vector with insecticides and blood transfusions, particularly in the Southern Cone countries (9). Nevertheless, Chagas' disease remains a public health problem, since the progress of such control programs in Latin America is uneven. Furthermore, the disease is now appearing in countries where it has not been endemic due to migration of infected individuals, most of them in chronic stages of the disease (8). To date, only two drugs are clinically available for the specific treatment of this disease: 2-nitroimidazole (benzimidazole [BZ]; Rochagan; Roche) and 5-nitrofurantoin (nifurtimox [NFX; Lampit; Bayer]). Both drugs possess limited efficacy during the acute phase (up to 80%) and especially in the chronic (8 to 20%) phase of infection (7). Furthermore, use of these drugs leads to frequent undesirable side effects, which can lead to discontinuation of treatment (7). The presence of *T. cruzi* strains that are naturally resistant to both BZ and NFX (13) may account for the low cure rates observed for some treated patients, even those in the acute

phase of infection. However, little is known about the influence of host parameters on therapeutic failures. One of the major factors potentially influencing the efficacy of treatment for Chagas' disease is the possible cooperative action between the drug effects and the host immunological response, which is particularly important in the context of immunosuppressed patients (3, 21, 24, 31, 34).

Host resistance to infection with *T. cruzi* is dependent on both innate and adaptive immune responses. During the first week of infection in mice, *T. cruzi* induces a host cellular response (4) to control parasite replication. Activation of cell-mediated immunity occurs through induction of interleukin-12 (IL-12) (1) and gamma interferon (IFN- γ) (40), which actively participate in macrophage activation during innate immune responses. Adaptive immune responses, which are mainly mediated by CD4⁺ T lymphocytes, seem to be the most effective means of controlling parasite replication (4). CD4⁺ T lymphocytes promote activation of macrophages and proliferation of CD8⁺ T and B lymphocytes (36). CD8⁺ T lymphocytes are involved in IFN- γ production and have specific cytolytic activity toward infected host cells, controlling intracellular parasite replication (17). B lymphocytes participate in infection control, producing immunoglobulins involved in opsonization and phagocytosis, as well as complement-mediated lysis (4). CD4⁺-T-lymphocyte (28, 29, 36), CD8⁺-T-lymphocyte (35, 39), and B-lymphocyte (26) deficiencies have all been shown to render

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ, 30.190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: 55-31-3349 7781. Fax: 55-31-3295-3115. E-mail: romanha@cpqrr.fiocruz.br.

[†] Published ahead of print on 10 November 2008.

experimental mammalian hosts hypersusceptible to *T. cruzi* infection, increasing parasitemia and mortality rates.

Details of the cooperative therapeutic effects of drugs and the host immune system on parasitic diseases such as avian malaria (34), murine schistosomiasis (10), and canine visceral leishmaniasis (25) have been reported in the literature. For Chagas' disease, immune system activation with recombinant IL-12 has been shown to enhance the efficacy of BZ chemotherapy in experimental acute models (18). Indeed, IFN- γ and IL-12-knockout (KO) mice demonstrated a reduced response to BZ treatment compared with wild-type (WT) mice (27). Furthermore, increased IFN- γ levels have been observed in patients treated and cured with BZ and NFX, compared with those who were not cured (2).

Novel antifungal triazole derivatives, developed for the treatment of invasive fungal infections, have arisen as an alternative treatment for Chagas' disease. These drugs are potent and selective inhibitors of *T. cruzi* ergosterol synthesis, which is essential for parasite growth and survival. In addition, they possess pharmacokinetic properties particularly suited to the control of this disseminated intracellular infection. Several triazole derivatives have been experimentally tested, including D0870 (20), posaconazole (POS) (19, 43), ravuconazole (44), albaconazole (15), and TAK-187 (42). In particular, POS (Schering-Plough Research Institute) was recently registered for the prophylaxis and treatment of invasive fungal infections in the European Union, Australia, and the United States. These drugs have also been shown to possess potent *in vitro* and *in vivo* anti-*T. cruzi* activities, curing acute and chronic parasitological mouse infections, even those caused by BZ-resistant strains (19). Therefore, POS is considered a rational candidate for clinical trials in Chagas' disease patients (41).

Recently, we demonstrated that the activity of POS in a murine model of acute Chagas' disease is much less dependent on IFN- γ than is that of BZ (11). The goal of the present work was to investigate the influence of T and B lymphocytes on POS and BZ anti-*T. cruzi* activity in a murine model of acute infection.

MATERIALS AND METHODS

Animals. C57BL/6 mice knocked out for major histocompatibility complex class II (CD4^{-/-} T lymphocyte KO), the gene for the β -2-microglobulin protein (CD4^{-/-} T lymphocyte KO), or the gene for the heavy chain of immunoglobulin μ (B lymphocyte KO), as well as C57BL/6 (WT) mice, were used in the present investigation. The animals were provided by the Departamento de Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP, São Paulo, Brazil). WT and KO male mice between 8 and 10 weeks of age were infected with *T. cruzi* and maintained under standard conditions of isolation at the animal house of the Centro de Pesquisa René Rachou, in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. All procedures involving the use of animals in the present study were performed according to the Ethical Principles in the Use of Laboratory Animals supplied by the Brazilian College of Animal Experimentation (Cobea) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (20a). In this regard, we applied the "3Rs Principle" (replacement, reduction, and refinement), which specifies that experiments may not be performed if another scientifically satisfactory method of obtaining the desired result that does not entail the use of animals is reasonably and practically available. Moreover, the experiments were designed to avoid or reduce distress and unnecessary pain and suffering for the experimental animals.

Mouse infection and parasitemia determination. WT and KO mice were infected via intraperitoneal injection with 5,000 blood trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi*, which had been maintained in our laboratory through serial passages in Swiss-Webster mice. Infection was confirmed 4 days postinfection (dpi) and followed up to the 60th day by examination of fresh blood

collected from the tails of mice. Parasitemia was measured daily from the 4th to the 16th dpi and thereafter every other day up to the 60th dpi (2).

Treatment of infected mice. On the 4th dpi, WT and KO mice began receiving oral treatment with POS (20 mg/kg of body weight/day, administered in two daily doses) or BZ (100 mg/kg/day, once a day), and the treatment continued for 20 consecutive days. BZ was dissolved in water containing gum arabic, and POS was suspended in 2% methylcellulose and 0.5% Tween 80. *T. cruzi*-infected, untreated, and vehicle-treated WT and KO mice were used as controls. Mice infected with the Y strain of *T. cruzi* were divided into the following experimental groups: WT untreated ($n = 20$), BZ-treated ($n = 20$), and POS-treated ($n = 18$); CD4^{-/-} T lymphocyte KO untreated ($n = 15$), BZ-treated ($n = 16$), and POS-treated ($n = 16$); CD4^{-/-} T lymphocyte KO untreated ($n = 11$), BZ-treated ($n = 20$), and POS-treated ($n = 16$); B lymphocyte KO untreated ($n = 12$), BZ-treated ($n = 18$), and POS-treated ($n = 14$).

Hemocultures. Hemocultures were used as an indicator of parasitological cure. On the 60th dpi, mice with no parasitemia, as observed by optical microscopy, were aseptically bled via the venous orbital sinus, and a volume of 0.5 ml of blood was drawn from each mouse. Blood samples were distributed into two tubes containing 5 ml of liver infusion tryptic medium (6). The tubes were incubated for 30 to 60 days at 28°C and then microscopically examined for parasite detection. In this work, negative direct fresh blood microscopic examination plus negative hemoculture was used as a semiquantitative measure of the relative effects of the drugs on the parasite load of animals in the different experimental groups. However, this methodology has limited sensitivity (40 to 80%) (23), and it can be considered only that the animals' parasitemia levels fall below the detection limit of the method.

Statistical analyses. Means and standard deviations of parasitemia levels were calculated with Microsoft Excel (Microsoft). Comparisons between parasitemia graphs for POS- and BZ-treated mice were carried out using the nonparametric Mann-Whitney method, since the data were asymmetric. The cure rates of infected, treated, and untreated mice were compared using the chi-square test and the Benferroni method with the Minitab software package (Minitab Inc., State College, PA). Survival analysis was carried out using the nonparametric Kaplan-Meier method and log rank test, implemented with the Arel v.2.4.2 software package for Mac (Gigawatt Ltd. Co., Oklahoma). Mean survival times were compared with the Tukey-Kramer test using the same package. Differences were considered significant when P was <0.05 .

RESULTS

C57BL/6 WT mice infected with *T. cruzi* are highly responsive to both POS and BZ treatments. The mean parasitemia levels of WT mice infected with the *T. cruzi* Y strain, untreated (control) or treated with BZ or POS, are shown in Fig. 1A. The WT mice exhibited patent parasitemia by 4 dpi, parasitemia reached a peak at 9 dpi and then became undetectable by 16 dpi. POS- and BZ-treated mice had subpatent parasitemia throughout the entire observation period, after which they were submitted to hemoculture; the animals in each experimental group exhibiting a decrease in parasitemia below the detection limit of these methods are listed as cured below and in Table 1 (see Materials and Methods). All infected, untreated WT mice (control) were dead by 28 dpi (mean survival time, 20.5 ± 4.9 days) (Fig. 2A). In contrast, all treated animals survived throughout the observation period (Fig. 2A). Cure rates were 0% for untreated WT mice and 95 or 89% for WT mice treated with BZ or POS, respectively (Table 1). There were significant differences in parasitemia, mortality, and cure rates between POS- or BZ-treated and untreated mice ($P < 0.001$). However, no significant differences were observed between POS- and BZ-treated WT mice.

CD4^{-/-} T-lymphocyte-KO mice are more susceptible to *T. cruzi* infection than are WT animals and are significantly less responsive to BZ and POS treatment. CD4^{-/-} T-lymphocyte-KO mice were highly susceptible to *T. cruzi* infection; untreated animals attained peak parasitemia levels that were

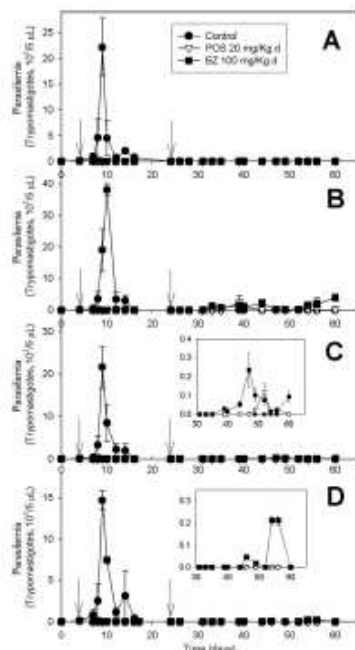


FIG. 1. Parasitemia of WT (A), CD4⁺T-lymphocyte-KO (B), CD8⁺T-lymphocyte-KO (C), and B-lymphocyte-KO (D) mice infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Closed circles, untreated mice; closed squares, BZ-treated mice; open inverted triangles, POS-treated mice. Arrows indicate the start and end of the treatment. The insets in panels C and D show the parasitemia levels on an expanded scale, from 30 to 60 days. For details, see Materials and Methods.

twofold higher than those of WT animals (Fig. 1B), and all died at 15 dpi (Fig. 2B). Treatment with BZ or POS maintained subpatent parasitemia levels throughout the treatment (from 4 to 24 dpi), but the infection reactivated 7 days after the end of BZ treatment and 11 days after the end of POS treatment, as evidenced by the presence of parasites in the bloodstream, and persisted intermittently throughout the rest of the observation period (Fig. 1B). The reactivation was intense and was associated with only 6% survival by 60 dpi among both groups of drug-treated animals (Fig. 2B; mean survival times, 53.5 ± 6.7 and 50.7 ± 6.7 days for BZ and POS, respectively). No significant differences in survival were observed by the

log-rank test among drug-treated animals ($P > 0.3$), but both treated groups demonstrated significantly greater survival rates than did untreated animals ($P < 0.001$). Moreover, no mice were cured in either the BZ- or the POS-treated CD4⁺T-lymphocyte-KO groups (Table 1).

CD8⁺T-lymphocyte-KO mice are more susceptible to *T. cruzi* infection than are WT animals but are responsive to both POS and BZ treatment. *T. cruzi*-infected and untreated CD8⁺T-lymphocyte-KO mice exhibited peak parasitemia at 9 dpi (Fig. 1C), similar to that of WT mice (Fig. 1A), and yet the mean survival time (15.4 ± 1.8 days [Fig. 2C]) was significantly shorter than that of WT animals (Fig. 2A). Parasitemia levels were subpatent for *T. cruzi*-infected CD8⁺T-lymphocyte-KO mice treated with either POS or BZ during the entire treatment period (Fig. 1C). Thereafter, low levels of circulating parasites were observed 15 days after the end of BZ treatment and 25 days after the end of POS treatment (Fig. 1C, inset). Reactivation of the infection was observed in 22% of the BZ-treated mice and in 13% of the POS-treated mice, and parasitemia persisted intermittently throughout the remainder of the observation period. The survival rates at 60 dpi were 0% for CD8⁺T-lymphocyte-KO untreated mice, 86% for BZ-treated mice, and 81% for POS-treated mice (Fig. 2C and Table 1), with mean survival times of 58.8 ± 3.0 and 59.6 ± 1.5 days for BZ-treated and POS-treated animals, respectively. Both treated groups had significantly higher rates of survival than did untreated animals ($P < 0.001$), but no significant differences in survival were observed between the treated animals ($P > 0.5$). The cure rates for treated CD8⁺T-lymphocyte-KO mice were 66% and 31% for BZ and POS treatments, respectively.

B-lymphocyte deficiency reduces the efficacy of BZ treatment but not that of POS. *T. cruzi*-infected and untreated B-lymphocyte-KO mice exhibited peak parasitemia at 9 dpi (Fig. 1D), similar to that of WT untreated mice (Fig. 1A), although the mean survival time (15.3 ± 0.78 days) was again significantly shorter than that of WT animals (Fig. 2D). Twenty-two days after the end of BZ treatment, the infection reactivated, as demonstrated by relapsed parasitemia (Fig. 1D, inset) in 56% of the BZ-treated mice. This relapse was associated with a decreased survival rate among these animals, which reached 67% by the end of the observation period (Fig. 2D). In contrast, no relapse of patent parasitemia was observed in infected B-lymphocyte-KO mice treated with POS, as demonstrated by a 100% survival rate for these animals during the observation period (Fig. 1D and 2D). There was a statistically significant difference in the survival not only of both treated groups compared with untreated animals ($P < 0.001$ [Table 1]) but also between POS- and BZ-treated animals ($P = 0.02$). The superior performance of POS in these animals was also reflected in the parasitological cure rates, which were 22% in BZ-treated mice and 71% in POS-treated mice (Table 1).

DISCUSSION

Previous investigations using humans and experimental models have demonstrated the importance of the host immune system in the efficacy of chemotherapeutic treatments against parasitic diseases (31, 34). In the present work, we investigated the effects of T- or B-lymphocyte deprivation on the anti-*T.*

TABLE 1. Parasitological cure and survival rates of WT and CD4⁺-T-lymphocyte-, CD8⁺-T-lymphocyte-, and B-lymphocyte-KO mice infected with the Y strain of *T. cruzi* and treated with POS or BZ

Mouse group	Results for treatment:									
	No treatment			BZ			POS			
	No. of mice surviving at 60 dpi/total no. (%)	Mean survival time (days) ± SD	No. of mice cured/total no. (%) ^a	No. of mice surviving at 60 dpi/total no. (%)	Mean survival time (days) ± SD ^b	No. of mice cured/total no. (%) ^a	No. of mice surviving at 60 dpi/total no. (%)	Mean survival time (days) ± SD ^b	No. of mice cured/total no. (%) ^a	
WT	0/20 (0)	20.5 ± 4.9	0/20 (0)	29/29 (100)	>60	25/29 (86)	18/18 (100)	>60	16/18 (89)	
CD4 ⁺ -T-lymphocyte KO	0/15 (0)	15	0/15 (0)	1/16 (6)	53.7 ± 6.6	0/16 (0)	1/16 (6)	50.5 ± 6.6	0/16 (0)	
CD8 ⁺ -T-lymphocyte KO	0/11 (0)	15.4 ± 1.8	0/11 (0)	25/29 (86)	58.8 ± 3.0	19/29 (66)	15/16 (94)	59.6 ± 1.5	5/16 (31)	
B-lymphocyte KO	0/12 (0)	15.3 ± 0.78	0/12 (0)	12/18 (67)	59.3 ± 1.5	4/18 (22)	14/14 (100)	>60	10/14 (71)	

^a Proportion of mice with negative parasitemia upon fresh blood examination and hemocultures after chemotherapy.

^b Results are biased because the mean survival times were calculated assuming the death (failure) of the survivors to be exactly 60 dpi, providing an underestimation of the true mean survival times when the observation period was limited.

crucif activity of POS and BZ in a murine model of acute Chagas' disease. Our results demonstrated substantial participation of the host immune system in the antiparasitic activity of both drugs.

BZ is currently the most frequently available drug for the treatment of Chagas' disease in countries where it is endemic. Previous work has shown that the efficacy of BZ is markedly reduced in immunosuppressed mice (27). Although the mechanism of BZ activity has not been clearly established, evidence suggests the involvement of reductive stress, in which reduced nitro radicals react with nucleic acids, proteins, and other macromolecules, forming stable covalent adducts (41). Because the effectiveness of BZ depends on host immune system activity, this could pose a limitation in the use of this drug, mainly in the treatment of immunodeficient and immunosuppressed Chagas' disease patients. However, several clinical studies have shown that BZ retains significant anti-*T. cruzi* activity in those patients, although no parasitological cures have been reported (12, 30, 32). Thus, one of the objectives for improved specific treatment of Chagas' disease is the ability of the drug to retain its activity even when the host is immunosuppressed. This possibility has already been suggested for POS (20, 41) POS treatment of cyclophosphamide-immunosuppressed mice infected with BZ-susceptible and BZ-resistant *T. cruzi* strains revealed trypanocidal activity similar to that observed in non-immunosuppressed mice (20). Furthermore, POS cure rates were consistently higher than those obtained with BZ treatment in the same experimental model. More recently, we have shown that the anti-*T. cruzi* activity of POS is less dependent on IFN- γ than that of BZ (11).

The results of the present work confirm that both POS and BZ effectively increase survival and induce parasitological cure in WT mice with acute *T. cruzi* infection. They also indicate that the antiparasitic activity of both drugs is reduced in lymphocyte-deficient mice; lymphocyte-KO mice infected with *T. cruzi* demonstrated higher susceptibility to infection, with increased levels of parasitemia and earlier mortality compared with those of WT mice (Fig. 1 and 2). CD4⁺-T-lymphocyte-KO mice treated with either POS or BZ had a 100% rate of infection reactivation a few days after the end of treatment, a very low survival rate (6%), and no evidence of parasitological cure

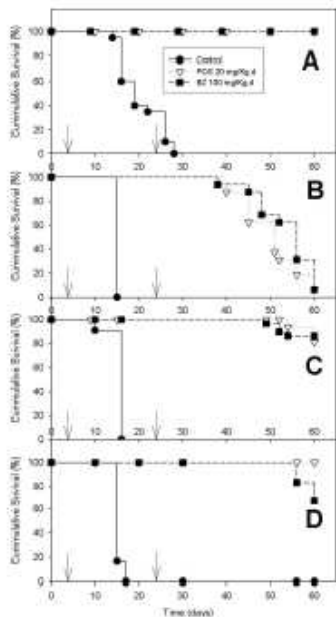


FIG. 2. Survival of WT (A), CD4⁺-T-lymphocyte-KO (B), CD8⁺-T-lymphocyte-KO (C), and B-lymphocyte-KO (D) mice infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Closed circles, nontreated mice; closed squares, BZ-treated mice; open inverted triangles, POS-treated mice. Arrows indicate the start and end of the treatment. For details, see Materials and Methods.

(Fig. 1 and 2, Table 1). The essential requirement of CD4⁺ T lymphocytes for drug efficacy may be due to their crucial helper function in CD8⁺-T-lymphocyte and B-lymphocyte activation, antibody production, and direct release of important cytokines, such as IFN- γ (4). Our results are in accordance with those previously described (28, 29) showing that *T. cruzi*-infected CD4⁺-T-lymphocyte-depleted mice demonstrate increased parasitemia levels and mortality rates. Several studies have confirmed that a deficiency in this immunological component leads to a reduced overall host immunological response and increased tissue parasitism (14, 28, 29, 37, 38). Strict dependence on CD4⁺ T lymphocytes for an effective chemotherapeutic response is particularly worrisome when chronic *T. cruzi*-infected patients are coinfecting with human immunodeficiency virus or in other contexts in which immunosuppression develops.

CD8⁺-T-lymphocyte-KO mice were also markedly less resistant to *T. cruzi* infection than were WT animals but more than CD4⁺-T-lymphocyte-KO animals. Other authors have also demonstrated that animals with deficiencies in the production of β -2 microglobulin show high parasitemia levels and die earlier than do WT-infected animals due to a deficient inflammatory response compared with that of WT mice (38). In this work, relatively low levels of infection reactivation and mortality were observed among treated CD8⁺-T-lymphocyte-KO mice compared with CD4⁺-T-lymphocyte-KO mice, but the level of parasitological cures dropped significantly in comparison with WT mice, particularly among PCS-treated animals (Table 1). The efficacy of both antiparasitic treatments in increasing the survival of CD8⁺-T-lymphocyte-KO mice may indicate important contributions of other components of the adaptive immune system in controlling the initial stages of infection, especially during BZ treatment. In this case, CD8⁺ T lymphocytes are probably most necessary during later stages of infection. Disease cure by BZ during the chronic phase of disease has recently been associated with the presence of a stable CD8⁺-T-lymphocyte population, which exhibits characteristics of memory central cells (5). This population is antigen independent, resulting in strong host protection, even against a new challenge. In contrast, there was a large decline in CD4⁺-T-lymphocyte levels after treatment during the chronic phase, demonstrating that this population degrades faster and that treatment is more effective during early stages of the disease. Other investigations have also shown that BZ treatment enhances the CD8⁺-T-lymphocyte response, building up resistance to reinfection (22). However, the presence of functional CD8⁺ T lymphocytes seems to be essential for the eradication of parasites in mice treated with PCS. The higher dependence of PCS activity on the presence of CD8⁺ T lymphocytes may reflect its specific activity against the intracellular (amastigote) stages, which require *de novo* ergosterol biosynthesis for survival and proliferation and are targeted by CD8⁺-T-lymphocyte cytolytic cells. B lymphocytes are important for the host immune response in controlling the late acute phase of *T. cruzi* infections, enabling circulating parasites to be removed. However, the humoral immune response resulting from B-lymphocyte activation during the acute phase of Chagas' disease is mostly non-specific (4), suggesting that B lymphocytes play a secondary role during this phase of the infection. *T. cruzi*-infected but untreated B-lymphocyte-KO mice exhibited par-

asitemia levels similar to those of WT infected mice, but their rate of mortality was greatly enhanced and the efficacy of BZ treatment was markedly reduced. In contrast, the antiparasitic action of PCS was much less affected, with full survival and cure rates close to those of WT treated animals (Table 1). The greater dependence of BZ activity on B lymphocytes might be related to the BZ mechanism of action, as BZ treatment induces nonspecific damage to its target cells that could expose parasite-specific antigens and induce the B-lymphocyte-mediated humoral immune response (16). The phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages against *T. cruzi* has been shown to increase in infected mice treated with BZ compared with nontreated animals (16). Additionally, BZ may preferentially target extracellular (trypomastigote) forms of the parasite, which are targets of the antibody-mediated immune response, while PCS acts selectively against the proliferative amastigote stages (see above), which are typically not susceptible to antibodies due to their intracellular location.

In conclusion, our results indicate that CD4⁺ T lymphocytes are essential for the *in vivo* trypanocidal activity of both BZ and PCS, probably due to the activating mechanism required for the adaptive cellular immune response, which is the main source of intracellular parasite control. PCS activity was more dependent on active CD8⁺ T lymphocytes than was that of BZ. In contrast, the activity of BZ was highly dependent on B lymphocytes, while PCS activity was almost completely retained in their absence. The varying dependence of PCS and BZ activity on distinct lymphocyte types may reflect the different parasite life stages targeted by the two drugs and their patterns of cooperation with the host immune system.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq, Brazil), Fundação Osvaldo Cruz (Brazil), and the Howard Hughes Medical Institute (Cherry Chase, MD; grant 55000620 to J.A.U.).

We thank João Santana Silva for providing the CD4⁺-T-lymphocyte-, CD8⁺-T-lymphocyte-, and B-lymphocyte-KO mice.

REFERENCES

- Alberdi, J. C. S., M. A. G. Cardoso, G. A. Martins, R. T. Gambrelli, L. Q. Vieira, and J. S. Silva. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64:1941-1947.
- Stábel-Oliveira, L. M. G., J. A. S. Gomes, J. B. Casagudo, T. C. Ferraz, E. M. Lamas, Z. M. P. Lou, M. C. Moreira, G. Gazzinelli, and R. Correa-Oliveira. 2000. Immunological and clinical evaluation of chronic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Infect. Dis.* 182:634-638.
- Bremer, J. 1982. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 4:297-306.
- Bremer, J., and R. T. Goodrich. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114:103-110.
- Dastanpour, J. M., L. M. Ribic, and R. L. Tarleton. 2008. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat. Med.* 14:542-550.
- Carosque, E. P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6:95-103.
- Carosque, E. P. 2003. Long term evaluation of etiologic treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 44:29-37.
- Dias, J. C. 2007. Globalization, inequality and Chagas disease. *Cell. Saúde Pública* 23(Suppl. 1):813-822.
- Dias, J. C., A. N. Moreira, and C. J. Schkebel. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 603-612.

10. Donnell, M. J., A. A. Saha, C. Fletcher, G. Webb, and J. Dale. 1997. Evidence for an immune-dependent action of pentamidine on *Leishmania* infection in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:547-549.
11. Ferraz, M. L., R. T. Gazzinelli, R. O. Alves, J. A. Uchida, and A. J. Rosenthal. 2007. The anti-*Trypanosoma* anti-activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1599-1604.
12. Ferreira, M. S., S. A. Shibasaki, et al. 1997. Douçura de Chagas e imunossupressão, p. 362-379. In J. C. Pinho Dias and J. Rodrigues Costa (ed.), *Clínica e terapêutica de doenças de Chagas*. Editora Focena, Rio de Janeiro, Brazil.
13. Floridi, L. S., and Z. Brener. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:755-759.
14. Gasparim da Costa, S. C., K. S. Calhazas, T. Zaroucha do Valle, and P. H. Lagrange. 2002. *Trypanosoma cruzi* infection patterns in intact and albino mice of susceptible and resistant genotypes. *Hum. Hereditas* 17:337-344.
15. Grotzer, P. M., J. A. Urbina, M. de Luna, L. C. Abramo, V. M. Vekos, W. L. Tafuri, G. L. Machado-Corleto, E. Chert, and M. T. DeMa. 2004. Activity of new triazole derivative albendazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog host. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4236-4242.
16. Lago-Silva, E., L. S. Floridi, and Z. Brener. 1990. Effect of the heat specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85:401-405.
17. Martins, D., and R. Tarleton. 2004. Occurrence, specificity, and fraction of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* 204:304-317.
18. Michalukewicz, V., S. M. F. Maria, L. Carvalho-Oliveira, M. E. S. Pereira, L. R. P. Ferreira, Z. Brener, A. J. Rosenthal, and R. T. Gazzinelli. 1998. Interleukin-12 enhances *in vivo* parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2545-2550.
19. Molina, J., C. Martins-Filho, Z. Brener, A. J. Rosenthal, B. Loebenberg, and J. A. Urbina. 2000. Activity of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:115-125.
20. Molina, J., Z. Brener, A. J. Rosenthal, and J. A. Urbina. 2000. In vivo activity of the bis-triazole 10670 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:137-140.
21. National Research Council. 2003. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy Press, Washington, DC.
22. Ojehart, B. P., A. P. de Sousa, V. Costa-de-Almeida, S. L. de Castro, and T. Araújo-Jorge. 2005. *Trypanosoma cruzi* alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benzimidazole therapy in mice. *Exp. Parasitol.* 144:228-234.
23. Ojehart, B. P., V. Costa-de-Almeida, and T. Araújo-Jorge. 2001. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8⁺ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:770-776.
24. Peres-da-Jardoa, A. A. 2004. Chronic Chagas' disease: from serodiagnosis and benzimidazole to polymerase chain reaction. *Rev. Saude Publica* 38:606.
25. Rassi, A., V. Amato Neto, A. F. Silveira, F. F. Filho, V. S. Amato, and A. Sant'Anna. 1959. Efeito protetor do benznidazol contra a restrição parasitária em parasitos cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* a fraldas com corticóides em virtude de alterações endócrinas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32:475-482.
26. Ribeiro, A., B. Shibasaki, S. Lortz, and C. L. Jeffe. 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before and after drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71:69-76.
27. Rodrigues, A. M., F. Santos, D. A. Klein, H. B. Brito, and A. Capena. 1983. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell deficient rats. *Infect. Immun.* 51:524-528.
28. Rosenthal, A. J., R. O. Alves, S. M. F. Maria, J. S. Silva, C. Bepari, and R. T. Gazzinelli. 2002. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: role of endogenous interferon- γ in mediating parasitologic cure. *J. Infect. Dis.* 186:822-828.
29. Sotomayor, M. E., M. Bekhalid, T. Ohno, K. Kristianson, T. Mak, H. Wigzell, and A. Oros. 1993. Differential susceptibilities of mice genetically deficient of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect. Immun.* 61:5120-5133.
30. Steinhilber, M. E., A. Blumberg, L. Spierberg, J. Altshuler, P. Petry, A. M. Reis, H. Wigzell, and A. Oros. 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol. Lett.* 45:53-60.
31. Santos, A. M., M. H. Lopes, L. A. Bonzonelli, E. Carrasco, A. M. Petry, E. V. Nunes, L. P. Hamano, and M. A. Sakuma-Yasuda. 1998. Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:784-788.
32. Salmeron-Avilés, R., D. M. Noll-Hodler, R. L. Munuera, J. D. Borja, M. Luna, A. Tristán-Carralón, J. C. Diaz, S. M. Hódar-Santos, and G. A. Martínez-Filho. 2005. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by acute risk adaptive immunity cells toward a type 1-mediated immune profile. *Scand. J. Immunol.* 64:594-595.
33. Selart, A., E. Sarmiento, C. Sepúlveda, D. Oñativ, G. Acuña, J. Labarca, S. Muñoz, G. Cruz, C. Brunaque, F. Vera, et al. 1993. Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* reactivation in a patient with hemophilia and AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 16:255-256.
34. Shibasaki, M. C., J. J. Izumi, and R. Shibasaki. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 23:585-588.
35. Targett, G. A. 1985. Chemotherapy and the immune response in parasitic infections. *Parasitology* 90:661-673.
36. Tarleton, R. L. 1993. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverts vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144:717-724.
37. Tarleton, R. L. 1995. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol. Today* 11:7-9.
38. Tarleton, R. L. 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol.* 8:13-22.
39. Tarleton, R. L., J. Sun, L. Zhang, and M. Postan. 1994. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitemia in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.* 62:1820-1829.
40. Tarleton, R. L., B. H. Keller, A. Laiter, and M. Postan. 1992. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* 356:338-340.
41. Torlon, E., B. Harnescu, M. T. Rivera, E. van Marck, A. Hillan, and V. Corlier. 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 146:3026-3032.
42. Urbina, J. A., and R. Docampo. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversia and advances. *Trends Parasitol.* 19:495-500.
43. Urbina, J. A., G. Pajares, C. Sanjof, J. Molina, R. Lima, Z. Brener, and A. J. Rosenthal. 2005. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21:49-55.
44. Urbina, J. A., G. Pajares, L. M. Contreras, A. Landa, C. Sanjof, J. Molina, M. Pira, B. Pira, N. Perez, P. Wucher, and B. Loebenberg. 1999. Anti-proliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1771-1777.
45. Urbina, J. A., G. Pajares, C. Sanjof, R. Lima, and A. J. Rosenthal. 2003. In vitro and in vivo activities of posaconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21:27-30.
46. World Health Organization. 2002. Report of the Expert Committee on the Control of Chagas Disease. WHO Tech. Rep. Ser. 942:6.

8.2 Artigo submetido

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Running title: Tc52 expression in *Trypanosoma cruzi* strains

***Trypanosoma cruzi* thiol transferase: protein expression levels in Benznidazole-susceptible and -resistant strains**

Marcela Lencine Ferraz, Fernanda Magalhães Freire Campos, Silvane Maria Fonseca

Murta & Alvaro José Romanha

*Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisa René Rachou,
FIOCRUZ, 30.190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil*

***Corresponding author.**

A. J. Romanha. E-mail address: romanha@cpqrr.fiocruz.br; Tel. 55-31-3349 7781; Fax:
55-31-3295-3115,

ABSTRACT

Thiol transferase (Tc52) is a *Trypanosoma cruzi* enzyme involved in thiol-disulphide redox reactions. Previous analyses have shown higher levels of Tc52 mRNA in the *T. cruzi* benznidazole (BZ)-resistant strain than in the BZ-susceptible one. Here we cloned, expressed and purified the recombinant Tc52 protein in order to compare protein expression levels in the BZ-resistant and susceptible *T. cruzi* strains. In western blot analysis the expression level of this polypeptide was the same in all *T. cruzi* strains tested

regardless of BZ resistance. Our results suggest that Tc52 is not directly involved in the *T. cruzi* mechanism of resistance to BZ.

Key words: Tc52; *Trypanosoma cruzi*; drug resistance.

INTRODUCTION

Thiol transferases are enzymes found in animals, yeast, bacteria and parasites. In *Trypanosoma cruzi*, this protein (previously named as TcAc2) was identified due to the presence of deoxyribonucleic acid (DNA) nucleotide motifs similar to those found in genes of glutathione-S-transferases (GSTs) and a group of proteins induced under different stress conditions (Schoneck et al. 1994). Moutiez et al (1995) isolated *T. cruzi* thiol transferase (Tc52), weighing 52 KDa, which represents a correlation between the glutathione-based metabolism of the host and the specific trypanothione-based metabolism of the parasite. This enzyme, according to the authors, would regulate the thiol-disulphide redox balance by reducing glutathione disulphide. Moreover, Tc52 is known to share structural and functional properties with thioredoxin and glutaredoxin proteins.

Our team has been studying the molecular mechanisms of *T. cruzi* drug resistance, in order to seek new chemotherapy targets (Murta et al, 2006; Nogueira et al, 2006; Rego et al, 2007). A previous study aimed at identifying differentially expressed genes in BZ-resistant and susceptible *T. cruzi* strains indicated a possible correlation between Tc52 upregulation and BZ resistance. By using Representation of Differential Expression, Tc52 overexpression was detected *in vitro* in the BZ-induced resistant population (17LER) and *in vivo* in the BZ-selected resistant population (BZR) when compared with the BZ-sensitive strains (17WTS and BZS) (Murta et al, 2008).

One of the priorities of the World Health Organization for the 2008-2009 biennium is to investigate rational targets for the development of drugs to be used in treating

neglected diseases (WHO, 2007). Here we evaluate the involvement of Tc52 protein in the *T. cruzi* mechanisms of drug resistance. Tc52 protein was cloned, expressed and purified. Its level of expression was then determined and compared in a panel of BZ-resistant and -susceptible *T. cruzi* strains.

METHODOLOGY

Eight *T. cruzi* strains were used in the present study: four BZ-susceptible and four BZ-resistant. Of the latter, two (VL-10 and YuYu) were naturally resistant and the other two (17 LER and BZR) were resistant either through experimental induction or selection (Filardi & Brener 1987; Nirdé et al. 1995; Murta & Romanha 1998). *Trypanosoma cruzi* total DNA was prepared as previously described by Nogueira et al. (2006). A 1,163 bp segment corresponding to part of a *Tc52* open reading frame (1,338 bp) (GenBank Accession No: [EF194063](#)) was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA from the 17WTS *T. cruzi* strain using the primers Tc52-F forward (5'-*CGAGCTCA*ATGCCGAGTGGTACAAGGAG-3') and Tc52-R reverse (5'-*CCAAGCTT*CACCTGCTGCCCAATCAAAAT-3'). (The sequences shown in italics and underlined correspond to the *SacI* and *HindIII* restriction sites, respectively). The PCR product was digested with *SacI* and *HindIII* restriction enzymes and then inserted into the corresponding sites of the Qiagen (Valencia, CA, USA) pQE-31 expression vector. The M-15 *Escherichia coli* strain was transformed with the pQE-31-Tc52 construct. Transformed cells were cultured for 6h in the presence of 1mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Promega, Madison, WI, USA). The 6x-His-tagged recombinant protein produced in *E. coli* M-15 was purified by electroelution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Proteins were assayed by the Bradford method (1976).

We aimed to confirm the recombinant protein identity by mass spectrometry, and run the bacterial protein extract on a 12% SDS-PAGE gel. The fragment corresponding to the recombinant Tc52 protein was excised from the gel, divided into smaller fragments and then subjected to tryptic digestion. Gel fragments were washed in 25 mM ammonium bicarbonate/50% acetonitrile until completely destained. After drying, each gel fragment was immersed in 50 μ L of protease solution (sequence grade modified trypsin, Promega, at 20 ng/ μ L in 25 mM ammonium bicarbonate) and placed on ice for 30 min. Excess protease solution was then removed and replaced by 20 μ L of 25 mM ammonium bicarbonate. Digestion was performed at 37 °C for 16 h. Peptide extraction was performed twice for 15 min by adding 30 μ L of 50% acetonitrile/5% formic acid. Trypsin digests were then concentrated in a SpeedVac (Savant) to about 10 μ L and desalted using Zip-Tip (C18 resin; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA). Peptide elution from the column was performed in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. The peptide mixture was analyzed by sequencing *de novo* in a MALDI-ToF-ToF spectrometer (Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer) as previously described by Andrade et al. (2008). The spectra obtained were compared to each other using the Mascot search program. The amino acid sequence derived from these spectra was used to query the NCBI database and identify the recombinant protein.

Polyclonal antiserum was produced by inoculating New Zealand white rabbits on days 0, 7 and 21 with 300 μ g of recombinant Tc52. Serum was collected on days 36 and 51. Polyclonal antibodies against *T. cruzi* HSP70 were previously obtained in a similar way (Murta et al. 2008). The procedures involving the use of animals in this study followed the Ethical Principles in the Use of Animals of Laboratory supplied by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the Manual on Care and Uses of Animals of Laboratory supplied by the National Research Council (2003). *Trypanosoma*

cruzi total proteins were obtained as previously described (Temperton et al. 1998). Proteins (20 µg) were separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked by incubation with 5% instant non-fat dried milk in 0.05% Phosphate buffered saline (PBS) Tween 20 (PBS-T) for 1h, then washed in PBS-T and incubated for 1h in the presence of antiserum raised against the recombinant Tc52 (dilution 1:1,000). The membranes were incubated for 1 h at room temperature in alkaline phosphatase-conjugated affinity-purified anti-rabbit IgG (Sigma) at a 1:6,000 dilution in PBS-T. Bands were revealed on each nitrocellulose membrane by treatment with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium reagents. To normalize expression levels, the same membrane was incubated in antiserum raised against the recombinant TcHSP70 (1:10,000), based on the same protocol described above.

RESULTS

In order to assess the expression levels of rTc52 in both BZ-sensitive and –resistant *T. cruzi* strains, we cloned and expressed the recombinant Tc52 protein. The resulting bacterial extracts were run on 12% SDS-PAGE gels. A 46 kDa band was obtained, corresponding to part of the six-histidine-tagged Tc52 protein. The highest rTc52 expression level was observed 2h after IPTG induction (Figure 1A). After solubilization of the rTc52 crude extract in PBS, both the soluble (supernatant) and insoluble (sediment) parts were run on 12% SDS-PAGE gels. rTc52 was found in the sediment (lane 2, Figure 1B). Protein purification was performed by electroelution (lane 3, Figure 2B). A volume of 2 ml with a concentration of 0.8 µg/ml protein was obtained. The rTc52 gel band was excised, trypsinized and submitted for molecular identification by MALDI-ToF-ToF mass spectrometry. The results proved Tc52 identity with a score of 246 for *T. cruzi* thiol

transferase (GenBank Accession No: [gi32395732](#)). The protein was identified by sequencing 10% of the peptides, with the molecular weight of 48,378 Da and an isoelectric point of 5.22. The western blot band intensities represented the Tc52 expression levels (Figure 2). The anti-rTc52 polyclonal antibody (1:1,000) appeared to be highly specific with a single band at 52 kDa corresponding to the expected size of the native *Tc52*. Densitometric analysis of band intensity corresponding to *Tc52*, normalized with HSP70, showed that the level of *Tc52* expression was the same for all *T. cruzi* strains regardless of their drug resistance phenotypes.

DISCUSSION

Tc52 is an enzyme that affects thiol levels, exhibiting structural homology to the glutathione S- transferases (GSTs), and has been shown to be crucial for *T. cruzi* survival and virulence (Allaoui et al. 1999). Furthermore, immunological investigations have shown that Tc52 has immunoregulatory activities (Fernandez-Gomes et al. 1998; Ouaisi et al. 2002; Borges et al. 2003). Drug resistance mediated by GSTs has been reported in insects, plants, tumor cells and parasites (revised by Ouaisi et al. 2002). In *T. cruzi*, BZ- and NFX- susceptibility has been associated with free and conjugated glutathione levels. An enhanced susceptibility to drugs was observed after adding buthionine sulfoximine, which reduces the concentration of glutathione in culture media (Moncada et al. 1989; Repetto et al. 1996). Moreover, Maya et al. (1997) observed different glutathione levels in *T. cruzi* strains, and that treatment with NFX and BZ reduced free thiols.

Experiments that we performed aiming to select differentially expressed genes of BZ- resistant and susceptible *T. cruzi* strains showed a possible correlation between Tc52 upregulation and BZ-resistance (Murta et al. 2008). Other enzymes involved in antioxidant defense systems have already been found to be related to drug resistance in *T. cruzi*. Murta

et al. (2006) observed that deletion of copies of genes encoding the *T. cruzi* Old Yellow enzyme (TcOYE) reduced approximately 7-fold the level of that protein expression in BZ-resistant strains. Likewise, Nogueira et al. (2006) reported the overexpression of the iron-containing enzyme superoxide dismutase-A (TcSOD-A) in *in vitro* BZ-selected resistant strains. Functional studies using the *TcSOD-B* enzyme have shown that parasites deficient in this gene are more susceptible to NFX and BZ (Prathalingham et al. 2007). Recently, Wilkinson et al. (2008) identified a nitroreductase type I (NTRI) enzyme in *T. cruzi* and *T. brucei*. They reported its role in the resistance to NFX and other nitro-derived drugs. So far, the NTRI enzyme has only been found in bacteria. It possesses a FMN co-factor and is involved in nitro-group reduction by two electrons leading to DNA damage, regardless of the concentrations of oxygen and other metabolites.

Differential expression of Tc52 was reported by Mathieu-Daudé et al. (2007) in representative clones of different *T. cruzi* strains. The authors correlated such difference with the biological variability of the strains, especially with virulence and immunosuppression properties of *T. cruzi*. Using western blots with specific anti-Tc52 polyclonal antibodies, we have not confirmed the differential expression of Tc52 in BZ-susceptible and –resistant *T. cruzi* strains.

In summary, we have also observed that *T. cruzi* resistance to nitro-derived substances seems not to be determined by a Tc52-dependent mechanism. Furthermore, as Tc52 is involved in the antioxidant complex system, one may not neglect the possibility that multiple factors, rather than a single enzyme, may be responsible for drug resistance in *T. cruzi*.

Acknowledgment: This work received financial support from the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq, Brazil), Fundação Oswaldo Cruz (Brazil) and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERENCES

- Allaoui A, François C, Zemzoumi K, Guilvard E, OuaiSSI A 1999. Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. *Mol Microbiol* 32:1273-1286.
- Andrade, HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ 2008. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benzimidazole. *J Proteome Res* 7:2357-2367.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Borges M, Da Silva AC, Sereno D, OuaiSSI A 2003. Peptide-based analysis of the amino acid sequence important to the immunoregulatory function of *Trypanosoma cruzi* Tc52 virulence factor. *Immunology* 109:147-155.
- Fairlamb AH, Cerami A 1985. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 14: 187-198.
- Fairlamb AH, Cerami A 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 46:695-729.
- Fernandez-Gomez R, Esteban S, Gomez-Corvera R, Zoulika K, OuaiSSI A 1998. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J Immunol* 160:3471-3479.
- Filardi LS, Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hygiene* 81:755-759.

- Garzón E, Borges MC, Cordeiro-da-Silva A, Nacife V, Meirelles MN, Guilvard E, Bosseno MF, Guevara AG, Brenière SF, Ouaiissi A 2003. *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chagas' disease in mice. *Immunol Letters* 89: 67-80.
- Mathieu-Daudé F, Bosseno MF, Garzón E, Lelièvre J, Sereno D, Ouaiissi A, Brenière SF 2007. Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains. *Parasitol Res* 101:1355-63.
- Moncada C, Repetto Y, Aldunate J, Letelier ME, Morello A 1989. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp Biochem Physiol C* 94:87-91.
- Moutiez M, Aumercier M, Schöneck R, Meziane-Cherif D, Lucas V, Aumercier P, Ouaiissi A, Sergheraert C, Tartar A 1995. Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 310: 433-437.
- Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ 2006. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146:151-162.
- Murta SM, Nogueira FB, Santos PF, Campos FM, Volpe C, Liarte DB, Nirdé P, Probst CM, Krieger MA, Goldenberg S, Romanha AJ 2008. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop* 107: 59-65.
- Murta SM, Romanha AJ 1998. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitol* 116:165-171.

- National Research Council, 2003. Manual on the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, DC.
- Nirdé P, Larroque C, Barnabé C 1995. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C R Academie Sci III* 318:1239-1244.
- Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM 2006. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TeFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop* 100:19-32.
- Ouaissi A, Ouaissi M, Sereno D 2002. Glutathione S-transferases and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. *Immunol Letters* 81:59-164.
- Rego JV, Murta SM, Nirdé P, Nogueira FB, Andrade HM, Romanha AJ 2008. *Trypanosoma cruzi*: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benznidazole-resistant and susceptible populations. *Exp Parasitol* 118:111-117.
- Repetto Y, Opazo E, Maya JD, Agosin M, Morello A, 1996. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp Biochem Physiol B* 115:281-285.
- Schöneck R, Plumas-Marty B, Taibi A, Billaut-Mulot O, Loyens M, Gras-Masse H, Capron A, Ouaissi A 1994. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biol Cell* 80:1-10.
- World Health Organization (WHO) 2007. Eighteenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases: progress 2005-2006. Geneva WHO, www.who.int.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM., Cheeseman I 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *PNAS* 105:5022-5027.

Legends

Figure 1 – A) *Escherichia coli* expression of the rTc52 protein. The protein was purified by 12% SDS-PAGE gel and Coomassie blue stained. 0, 2, 4 and 6 – hours of induction by IPTG. B) Solubility and purification of rTc52. Lane 1- Supernatant, Lane 2- Sediment and Lane 3 – rTc52 purified fraction. For further details, see Materials and Methods.

Figure 2 – Analysis of the Tc52 expression level in BZ-sensitive and -resistant *Trypanosoma cruzi* strains determined by western blot. (S) – BZ-susceptible and (R) –BZ-resistant strains. 20µg of protein was applied in each lane.

Figure 1

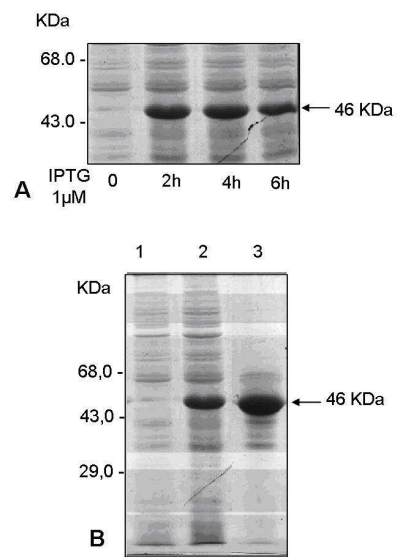
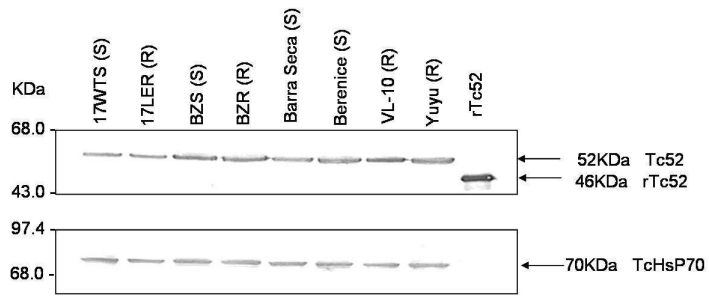


Figure 2



9 Referências bibliográficas

- Abrahamsohn, I. A., Silva, A. P. G., Coffman, R. (2000). Effects of Interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 68: 1975-1979.
- Adis International. (2003). Posaconazole: SCH 56592. *Drugs R D* 4: 258-263.
- Afeltra, J., R. G. Vitale, et al. (2004). Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1335-43.
- Ali, M. M., Baraka, O. Z., Abdelrahman, S. I., Sulaiman, S. M., Williams, J. F., Homeida, M. M., Mackenzie, C. D. (2003). Immune responses directed against microfilariae correlate with severity of clinical onchodermatitis and treatment history. *J Infect Dis* 187: 714-717.
- Allaoui, A., C. Francois, et al. (1999). Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. *Mol Microbiol* 32(6): 1273-86.
- Altan, N., Y. Chen, et al. (1999). Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4432-7.
- Amato Neto, V., Shikanai Yasuda, M. A., Amato, V. S. (1997). "Doença de Chagas aguda". In: Dias JCP, Coura JR. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. p 127-133.
- Andrade, H.M., Murta, S.M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P., Romanha, A.J. (2008). "Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole". *J Proteome Res* 7: 2357-2367.
- Aperis, G. and E. Mylonakis (2006). Newer triazole antifungal agents: pharmacology, spectrum, clinical efficacy and limitations. *Expert Opin Investig Drugs* 15(6): 579-602.
- Araújo, M. S., Martins-Filho, O. A., Pereira, M. E., Brener, Z. (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* 45 (6):819-24.

Avila, A. R., S. F. Yamada-Ogatta, et al. (2001). Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 117(2): 169-77.

Bahia-Oliveira, L. M. G., Gomes, J. A. S., Cançado, J. R., Ferrari, T. C., Lemos, E. M., Luz, Z. M. P., Moreira, M. C., Gazzinelli, G., Corrêa-Oliveira, R. (2000). Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis* 182:634-638.

Bahia-Oliveira, L. M. G., Gomes, J. A. S., Rocha, M. O. C., Moreira, M. C. V., Lemos, E. M., Luz, Z. M. P., Pereira, M. E. S., Coffman, R. L., Dias, J. C. P., Cançado, J. R., Gazzinelli, G., Corrêa-Oliveira, R. (1998). IFN- γ human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res.* 31: 127-131.

Barderi, P., O. Campetella, et al. (1998). The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J* 330 (Pt 2): 951-8.

Benaim, G., J. M. Sanders, et al. (2006). Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem* 49(3): 892-9.

Bouhdidi, A., Truyens, C., Rivera, M. T., Bazin, H., Carlier, Y. (1994). *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotopic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2 concentrations and highly avid IgG1 antibodies. *Parasite Immunol* 16: 69-76.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

Braga, M. S., Lauria-Pires, L., Argañaraz, E. R., Nascimento, R. J., Teixeira, A. R. (2000). Persistent infections in chronic Chagas' Disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 42:157-161.

Brener Z. and Chiari, E. (1967). Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev Inst Med trop S Paulo* 9:197-207.

- Brener, Z. (1984). Recent advances in the chemotherapy of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 79: 149-155.
- Brener, Z. and Gazzinelli, R. T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 114:103-110.
- Brodskyn, C. I. and Barral-Netto, M. (2000). Resposta imune humana na doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171-176.
- Buckner, F. S., Joubert, B. M., Boyle, S. M., Eastman, R. T., Verlinde, C. L. M. J., Matsuda, S. P. T. (2003). Cloning and analysis of *Trypanosoma cruzi* lanosterol 14 α demetilase. Mol Bioch Parasitol. 132: 75-81.
- Bustamante, J. M., Bixby, L. M., Tarleton, R. L. (2008). Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. Nat Med 14 (5):542-50.
- Caldas, R. A., E. F. Araujo, et al. (1980). Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol 66(2): 213-6.
- Callahan, H. L. and S. M. Beverley (1992). A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. J Biol Chem 267 (34): 24165-8.
- Camargo, E. P. (1964). Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 12: 93-100.
- Camargos, E. R. S., Franco, D. F., Garcia, C. M. M. G., Dutra, A. P., Teixeira, A. L., Chiari, E., Machado, C. R. S. (2000). Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. Am J Trop Med Hyg. 62: 604-612.
- Campos, F. M. F. (2004). Caracterização da proteína de choque térmico de 70KDa (HSP70) em cepas de *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. Monografia de conclusão de curso. Belo Horizonte: PUC/MG. 49 p.

- Campos, F. M., Liarte, D. B., Mortara, R. A., Romanha, A. J., Murta, S. M. (2009) Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 111(1):56-63.
- Cançado, J. R. (1999). Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94, Suppl. I: 331-335.
- Cançado, J. R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44 (1): 29-37.
- Cardillo, F., Voltarelli, J., Reed, S. G., Silva, J. S. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. *Infect Immun.* 64: 128-134.
- Cardoso, C. M., L. M. Almeida, et al. (2004). "Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants." *Chem Biol Interact* 148(3): 149-61.
- Carneiro, V. T. and R. A. Caldas (1983). Regulatory studies of L-glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B* 75(1): 61-4.
- Cazzulo, J. J., S. M. Juan, et al. (1977). Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B* 56(3): 301-3.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo so *Schyzotripanum cruzi*; n. gen., n., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1: 1-59.
- Chen, Y., M. Schindler, et al. (1999). A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification. *J Biol Chem* 274(26): 18364-73.
- Chunge, C. N., Gachihi, G., Muigai, R., Wasunna, K., Rashid, J. R., Chulay, J. D., Anabwani, G., Oster, C. N., Bryceson, A. D. (1985). Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. III. Successful treatment using a combination of sodium stibogluconate plus allopurinol. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79 (5):715-8.
- Church, G. M. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 81: 1991-1995.

- Cordeiro, F. D., Martins-Filho, A. O., Rocha, M. O. C., Adad, S. J., Corrêa-Oliveira, R., Romanha, A. J. (2001). Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas disease. *Clin Diag Lab Immun.* 8: 112 – 118.
- Coura, J. R. & De Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97: 3-24.
- Courchesne, W. E. (2002). Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 195-9.
- Courtney R, Pai S, Laughlin M, Lim J, Batra V. (2003). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 47(9):2788-95.
- Cruz-Robes, D., Reyes, P. A., Montéon-Padilla, V. M., Ortiz-Muñiz, A. R., Vargas-Alarcón, G. (2004). MHC class I and class II genes in mexican patients with Chagas disease. *Human Immunol.* 65: 60-65.
- Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., Stewart, T. A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259 (5102):1739-42.
- De Castro, S. L. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 53: 83-98.
- Denton, H., J. C. McGregor, et al. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* 381(Pt 2): 405-12.
- Dias, J. C. (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*
- Dias, J. C. P. (2000). Epidemiologia. *In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 379-388.

- Dias, J. C., A. C. Silveira, et al. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (5): 603-12.
- Diazgranados, C. A., Saavedra-Trujillo, C. H., Mantilla, M., Valderrama, S. L., Alquichire, C., Franco-Paredes, C. (2009). Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *Lancet Infect Dis.* 9 (5):324-30.
- DNDi. (2009) Drugs for neglected disease initiative. Doença de Chagas. [cited 2009 Jun 05]. Available from: <http://www.dndi.org.br>.
- Docampo, R., and Moreno, S. N. (1984). Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis* 6: 223-228.
- DosReis, G. A. (1997). Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol today.* 13: 335-342.
- Duschak, V. G. and J. J. Cazzulo (1991). Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 67 (2): 131-5.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309 (5733): 409-15.
- Fairlamb, A. H. and A. Cerami (1985). Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 14 (2): 187-98.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Fernandez-Gomez, R., S. Esteban, et al. (1998). *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J Immunol* 160(7): 3471-9.

- Ferraz, M. L., R. T. Gazzinelli, et al. (2007). The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 51(4): 1359-64.
- Ferreira, M. S., Lopes, E. R., Chapadeiro, E., Dias, J. C. P., Ostermayer, A. L. (2002). Doença de Chagas. *In: Veronesi R & Focaccia R. Tratado de Infectologia*. Ed. Atheneu. 2^a ed. p 1195-1233.
- Ferreira, M. S., Nishioka Sde, A., Silvestre, M. T., Borges, A. S., Nunes-Araújo, F. R., Rocha, A. (1997). Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 25 (6):1397-400.
- Filardi, L. S. and Z. Brener (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5): 755-9.
- Galhardo, M. C. G., Martins, I. A., Moreno, A. H., Xavier, S. S., Coelho, J. M. C., Vasconcelos, A. C. V., Ribeiro, R. S. (1999). Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 291-294.
- Garzón, E., Borges, M. C., Cordeiro-da-Silva, A., Nacife, V., Meirelles Mde, N., Guilvard, E., Bosseno, M. F., Guevara, A. G., Brenière, S. F., Ouaisi, A. (2003). *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chagas' disease in mice. *Immunol Lett* 89 (1):67-80.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, P., Hienv, L., Sher, A. (1992). The microbial activity of IFN-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *Eur J Immunol*. 22: 2501-2506.
- Gobec, S., P. Brozic, et al. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 15(23): 5170-5.

- Gonçalves da Costa, S. C., Calabrese, K. S., Valle, T. Z., Lagrange, P. H. (2002). *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in tact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol Histopathol* 17: 837-844.
- Grant, A. W., G. Steel, et al. (2003). A novel aldo-keto reductase from *Escherichia coli* can increase resistance to methylglyoxal toxicity. *FEMS Microbiol Lett* 218 (1): 93-9.
- Guimarães, A. C., Otto, T. D., Alves-Ferreira, M., Miranda, A. B., Degraeve, W. M. (2008). In silico reconstruction of the amino acid metabolic pathways of *Trypanosoma cruzi*. *Genet Mol Res* 7 (3):872-82.
- Gupta, S. S., V. K. Ton, et al. (2003). "Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis." *J Biol Chem* 278 (31): 28831-9.
- Inoue, S., R. C. Sharma, et al. (1993). Cellular detoxification of tripeptidyl aldehydes by an aldo-keto reductase. *J Biol Chem* 268 (8): 5894-8.
- Jez, J. M., T. G. Flynn, et al. (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* 54 (6): 639-47.
- Jin, Y. and Penning, T. M. (2007). Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 263-92.
- Jockers-Scherübl, M. C., Schirmer, R. H., Krauth-Siegel, R. L. (1989). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur J Biochem* 180 (2):267-72.
- Kinnamon, K. E., Poon, B. T., Hanson, W. L., Waits, V. B. (1998). Activity of anticancer compounds against *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 58 (6):804-6.
- Klein, S. L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 24 (6):627-38.
- Ko, J., I. Kim, et al. (2005). Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli* aldo-keto reductases. *J Bacteriol* 187 (16): 5782-9.
- Krettli, A. U. and Brener, Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol.* 128: 2009-2012.

- Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Steurer, F., Lawrence, G., Kubak, B., Radhakrishna, S., Leiby, D., Herron, R., Mone, T., Hunter, R., Kuehnert, M., et al. (2009). Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis* 48 (11): 1534-40.
- Lages-Silva, E., Filardi, L. S., Brener, Z. (1990). Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 85: 401-405.
- Lavie, Y., H. Cao, et al. (1997). Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *J Biol Chem* 272 (3): 1682-7.
- Lelchuk, R., Cardoni, R. L., Fuks, A. S. (1977a). Cell-mediated immunity in Chagas' disease: Alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (nifurtimox). *Clin Exp Immunol* 30: 434-438.
- Lelchuk, R., Cardoni, R. L., Levis, S. (1977b). Nifurtimox-induced alterations in the cell-mediated immune response to PPD tin guinea-pigs. *Clin Exp Immunol* 30: 469-473.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-8.
- Lorand, T. and B. Kocsis (2007). Recent advances in antifungal agents. *Mini Rev Med Chem* 7(9): 900-11.
- Macêdo, V. O. (1997). Forma indeterminada da doença de Chagas. *In: Dias JCP & Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Ed. FIOCRUZ. p 135-151.*
- Madalosso, G., Pellini, A. C., Vasconcelos, M. J., Ribeiro, A. F., Weissmann, L., Oliveira Filho, G. S., Penalva de Oliveira, A. C., Vidal, J. E. (2004). Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 46 (4):199-202.
- Mandlekar, S. and A. N. Kong (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 6 (6): 469-77.

Mathieu-Daude, F., M. F. Bosseno, et al. (2007). Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains. *Parasitol Res* 101 (5): 1355-63.

Maya, J. D., Y. Repetto, et al. (1997). Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 86 (1): 101-6.

Mayxay, M., Chotivanich, K., Pukrittayakamee, S., Newton, P., Looareesuwan, S., White, N. J. (2001). Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 918-923.

Meckert, P. C., Chambo, J. G., Laguens, R. P. (1988). Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with nifurtimox and relation to response immune. *Antim Agents Chemother.* 32: 241-245.

Meierjohann, S., R. D. Walter, et al. (2002). Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 368 (Pt 3): 761-8.

Michailowsky, V., Murta, S. M. F., Carvalho-Oliveira, L., Pereira, M. E. S., Ferreira, L. R. P., Brener, Z., Romanha, A. J., Gazzinelli, R. T. (1998). Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of Benznidazol during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*". *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 2549-2556.

Michailowsky, V., Silva, N. M., Rocha, C. D., Vieira, L. Q., Lannes-Vieira, J., Gazzinelli, R. T. (2001). Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 159: 1723-1733.

Miguel, D. C., J. K. Yokoyama-Yasunaka, et al. (2007). Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *J Antimicrob Chemother* 60 (3): 526-34.

Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Uliana, S. R. (2008). Tamoxifen Is Effective in the Treatment of *Leishmania amazonensis* Infections in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2(6):e249.

Miguel, D. C., Zauli-Nascimento, R. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Katz, S., Barbieri, C. L., Uliana, S. R. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother* 63 (2):365-8.

Minoprio, P. M., Eisen, H., Forni, L., D'Império Lima, M. R., Joskowicz, M., Coutinho, A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I Quantification of both T-and B-cell response. *Scand J Immunol.* 24: 661 – 668.

Mishra, J., A. Saxena, et al. (2007). Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 14 (10): 1153-69.

Molina, J., O. Martins-Filho, et al. (2000). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (1): 150-5.

Moncada C, Repetto Y, Aldunate J, Letelier ME, Morello A. (1989). Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp Biochem Physiol C* 94 (1):87-91.

Moore, C. C., Jacob, S. T., Pinkerton, R., Banura, P., Meya, D. B., Reynolds, S. J., Kenya-Mugisha, N., Mayanja-Kizza, H., Scheld, W. M.; Promoting Resource-Limited Interventions for Sepsis Management in Uganda (PRISM-U) Study Group. (2009). Treatment of severe sepsis with artemether-lumefantrine is associated with decreased mortality in Ugandan patients without malaria. *Am J Trop Med Hyg* 80 (5):723-8.

Moran, M., Guzman, J., Ropars, A. L., et al. (2009). Neglected disease research and development: how much are we really spending?. *Plos Med.* 6 (2):e30.

Moutiez, M., M. Aumercier, et al. (1995). Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 310 (Pt 2): 433-7.

- Murta, S. M. and A. J. Romanha (1998). In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116 (Pt 2): 165-71.
- Murta, S. M. F., Ropert, C., Alves, R. O., Gazzinelli, R. T., Romanha, A. J. (1999). In-vivo treatment with benznidazol enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Paras Immunol.* 21: 535-544.
- Murta, S. M., M. A. Krieger, et al. (2006). Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146 (2): 151-62.
- Murta, S. M., R. T. Gazzinelli, et al. (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93 (2): 203-14.
- Murta, S. M., W. G. dos Santos, et al. (2001). Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol Biochem Parasitol* 117 (2): 223-8.
- Murta, S.M., Nogueira, F.B., Dos Santos, P.F., Campos, F.M., Volpe, C., Liarte, D.B., Nirdé, P., Probst, C.M., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Romanha, A.J. (2008). Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop.* 107: 59-65.
- Nielsen, T. W. (1992). "Trans-splicing in protozoa and helminthes". *Infect Agents Dis* 7: 212-218.
- Nirde, P., C. Larroque, et al. (1995). Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C R Acad Sci III* 318 (12): 1239-44.
- Nogueira, F. B., M. A. Krieger, et al. (2006). Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop* 100 (1-2): 119-32.

- Nogueira, F. B., Ruiz, J. C., Robello, C., Romanha, A. J., Murta, S. M. (2008). Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol res.* 104 (4): 835-44.
- Nomeir, A. A., Kumari, P., Hilbert, M. J., Gupta, S., Loebenberg, D., Cacciapuotti, A. et al. (2000). Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antim Agents Chemother* 44: 727-731.
- Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., Maser, E. (2008). Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol Lett.* 181 (1):1-6.
- Oliveira, M. A., Santiago, H. C., Lisboa, C. R., Ceravollo, I. P., Trinchieri, G., Gazzinelli, R. T., Vieira, L. Q. (2000). *Leishmania* sp.: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. *Exp Parasitol.* 95: 96-105.
- Olivieri, B. P. (2004). Aspectos da resposta imune de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* submetidos a estratégias terapêuticas tripanocidas e imunomodulatórias. Tese de doutorado. Rio de Janeiro: IOC/FIOCRUZ, 193p.
- Olivieri, B. P., Cotta-de-Almeida, V., Araújo-Jorge, T. (2002). Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antim Agents Chemother.* 46: 3790-3796.
- Organización Panamericana de la Salud - OPAS. (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. OPAS/HDM/CD/425-06.
- Ouaissi, A., A. Guevara-Espinoza, et al. (1995). A novel and basic mechanism of immunosuppression in Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* releases in vitro and in vivo a protein which induces T cell unresponsiveness through specific interaction with cysteine and glutathione. *Immunol Lett* 48 (3): 221-4.
- Ouaissi, A., E. Guilvard, et al. (2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168 (12): 6366-74.

- Ouellette, M. and P. Borst (1991). Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol* 142 (6): 737-46.
- Oury, B., F. Tarrieu, et al. (2005). *Trypanosoma cruzi*: sequence polymorphism of the gene encoding the Tc52 immunoregulatory-released factor in relation to the phylogenetic diversity of the species. *Exp Parasitol* 111 (3): 198-206.
- Paniz-Mondolfi, A. E., Pérez-Alvarez, A. M., Reyes-Jaimes, O., Socorro, G., Zerpa, O., Slova, D., Concepción, J. L. (2008). Concurrent Chagas' disease and borderline disseminated cutaneous leishmaniasis: The role of amiodarone as an antitrypanosomatidae drug. *Ther Clin Risk Manag* 4 (3):659-63.
- Parvez, S., H. Tabassum, et al. (2006). Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology* 225 (2-3): 109-18.
- Perry, K. and N. Agabian (1991). mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia* 47 (2): 118-28.
- Piaggio, E., Roggero, E., Pitashny, M., Wietzerbin, J., Bottasso, A. O., Revelli, S. S. (2001). Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 87: 539-547.
- Pinto, A. Y., Valente, S. A., Valente, V. da C., Ferreira Junior, A., Coura, J. R. (2008). Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 41 (6):602-14.
- Prado, J. C. Jr., Levy, A. M., Leal, M. P., Bernard, E., Kloetzel, J. K. (1999). Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 85 (10): 826-9.
- Prathalingham, S. R., Wilkinson, S. R., Horn, D., Kelly, J. M. (2007). Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodbl* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (2):755-8.
- Rassi Júnior, A., Rassi, S. G., Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 76: 86-96.

Rassi, A. Jr., Dias, J. C., Marin-Neto, J. A., Rassi, A. (2009). Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart* 95 (7):524-34.

Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. (2000). Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23 (12): 883-9.

Rego, J. V., S. M. Murta, et al. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benzimidazole-resistant and susceptible populations. *Exp Parasitol*. 118 (1): 111-7.

Reis, G. A. and Lopes, M. F. (2000). A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 153-169.

Repetto Y, Opazo E, Maya JD, Agosin M, Morello A. (1996). Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 115 (2):281-5.

Rezende, J. M. (1997). O aparelho digestivo na doença de Chagas – Aspectos clínicos. In: Dias JCP & Coura JR. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Ed. FIOCRUZ. p 153-176.

Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., Jaffe, C. L. (1999). Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniosis before, and after, drug treatment. *Vet Immun Immunop*. 71: 69-76.

Ribeiro, I., Sevcsik, A. M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M. O., Chang, S., Pecoul, B. (2009). New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3(7): e484.

Rocha, A., Meneses, A. C. O., Silva, A. M., Ferreira, M. S., Nishioka, A. S., Burgarelli, M. N. K.; Almeida, E., Turcato Jr, G., Metze, K., Lopes, E. R. (1994). Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Amer Soc Trop Med Hyg*. 50: 261-268.

Roggero, E., Perez, A., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., Serra, E., Revelli, S., Bottaso, O. (2002). Differential susceptibility to acute *Trypanosoma*

cruzi infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. Clin Exp Immunol. 28: 421-428.

Rohloff, P. and R. Docampo (2006). Ammonium production during hypo-osmotic stress leads to alkalization of acidocalcisomes and cytosolic acidification in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 150 (2): 249-55.

Romanha, A. J., R. O. Alves, et al. (2002). Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. J Infect Dis 186 (6): 823-8.

Rosenthal, C. (1995). Resistance and combined use of anti-HIV drugs. Rev Soc Bras Med Trop 28 Suppl 2:9-18.

Rottenberg, M. E., Bakhiet, M., Olsson, T., Kristensson, K., Mak, T., Wigzell, H., Orn, A. (1993). Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. Infect Immun 61: 5129-5133.

Rottenberg, M. E., Riarte, A., Sporong, L., Altecheh, J., Petray, P., Ruiz, A. M., Wigzell, Orn, A. (1995). Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. Immunol Letters 45: 53-60.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor.

Sanchez-Burgos, G., R. G. Mezquita-Vega, et al. (2007). Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 50 (3): 333-41.

Sartori, A. M., Lopes, M. H., Benvenuti, L. A., Caramelli, B., di Pietro, A., Nunes, E. V., Ramirez, L. P., Shikanai-Yasuda, M. A. (1998). Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. Am J Trop Med Hyg 59 (5):784-6.

Schering-Plough Research Corporation (2004). Schering-Plough News Release. Posaconazole. [cited 2004 Nov 24]. Available from: <http://www.schering-plough.com>.

- Schofield, C. J., J. Jannin, and R. Salvatella. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22: 583-8.
- Schoneck, R., B. Plumas-Marty, et al. (1994). *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biol Cell* 80 (1): 1-10.
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W. E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (21):10188-92.
- Serrano-Martín, X., García-Marchan, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. (2009). Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(4):1403-10.
- Silva, L. H. P. & Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica.* 20: 191-208.
- Soeiro, M. N. C., Dantas, A. P., Daliry, A., Silva, C. F., Batista, D. G. J., Souza, E. M., Oliveira, G. M., Salomão, K., Batista, M., Pacheco, M. G. O., Silva, P. B., Santa-Rita, R. M., Menna Barreto, R. F., Boykin, D. W., Castro, S. L. (2009). Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 301-310.
- Solari, A., Saavedra, H., Sepúlveda, C., Oddó, D., Acuña, G., Labarca, J., Muñoz, S., Cuny, G., Brengues, C., Veas, F., et al. (1993). Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS. *Clin Infect Dis* 16 (2):255-9.
- Sorensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115 (2):113-28.
- Souza, E. M., Rivera, M. T., Araújo-Jorge, T. C., de Castro, S. L. (2001). Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol Res* 87 (7):513-20.

- Tai, H. L., T. S. Lin, et al. (2007). Overexpression of aldo-keto reductase 1C2 as a high-risk factor in bladder cancer. *Oncol Rep* 17 (2): 305-11.
- Taliaferro, W. H. (1948). The role of the spleen and lymphoid macrophage system in the quinine treatment of *Gallinaceum malaria*: I Acquired immunity and phagocytosis. *J Infect Dis.* 83: 164-180.
- Targett, G. A. (1985). Chemotherapy and the immune response in parasitic infections. *Parasitology.* 90: 661-673.
- Tarleton, R. L. (1995). The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol today* 11: 7-9.
- Tarleton, R. L., Grusby, M. J., Postan, M., Glimcher, L. H. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* 8: 13-22.
- Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A., Postan, M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature.* 356: 338-340.
- Teixeira, S. M. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res* 31 (12): 1503-16.
- Thomson, L., A. Denicola, et al. (2003). The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* 412 (1): 55-64.
- Torrico, F., Heremans, H., Rivera, M. T., van Marck, E., Billiau, A., Carlier, Y. (1991). Endogenous IFN- γ required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 146: 3626-3632.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Ullu, E. & Nielsen, T. (1995). Molecular biology of protozoan and helminthes parasites. *In: Biochemistry an molecular biology of parasites.* New York, Academic Press LTD, 1-17.

- Urbina, J. A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 (Suppl. I): 311-318.
- Urbina, J. A. (1997). Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*. 114: S91-S99.
- Urbina, J. A. (1999). Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 349-55.
- Urbina, J. A. and V. Azavache (1984). "Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. II. NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase." *Mol Biochem Parasitol* 11: 241-55.
- Urbina, J. A., Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitol* 19: 495-500.
- Urbina, J. A., G. Payares, et al. (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (7): 1771-7.
- Urbina, J. A., G. Payares, et al. (2003a). In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents* 21 (1): 27-38.
- Urbina, J. A., K. Lazard, et al. (1993). Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother* 37(3): 580-91.
- Uzcategui, N. L., Figarella, K., Camacho, N., Ponte-Sucre, A. (2005). Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant *Leishmania* parasites. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140 (3-4):395-402.
- Vanhame, L. and Pays, E. (1995). Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59: 223-240.

Vargas-Villavicencio, J. A., Larralde, C., De León-Nava, M. A., Escobedo, G., Morales-Montor, J. (2007). Tamoxifen treatment induces protection in murine cysticercosis. *J Parasitol* 93 (6):1512-7.

Walter, R. D. and F. Ebert (1979). Evidence for NADH- and NADPH-linked glutamate dehydrogenases in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Protozool* 26 (4): 653-6.

Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Nat Acad Sci U S A* 105: 5022-5027.

Wiseman, H., M. J. Laughton, et al. (1990). The antioxidant action of tamoxifen and its metabolites. Inhibition of lipid peroxidation. *FEBS Lett* 263 (2): 192-4.

World Health Organization (WHO). (2007). Eighteenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases: progress 2005-2006. Geneva WHO. disponível em: www.who.int.

Wsol, V., Szotakova, B., Martin, H. J., Maser, E. (2007). Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology* 238 (2-3):111-8.

Xu, D., X. Liu, et al. (2006). "Methylglyoxal detoxification by an aldo-keto reductase in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 7002." *Microbiology* 152 (Pt 7): 2013-21.

Zhang, Y. Q. and R. Rao (2007). Global disruption of cell cycle progression and nutrient response by the antifungal agent amiodarone. *J Biol Chem* 282 (52):37844-53.

Zuniga, E., C. Montes, et al. (1999). Antibodies against *Trypanosoma cruzi* alkaline antigens are elicited in sera from acute but not chronic human chagasic patients. *Clin Immunol* 93 (1): 81-9.