

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

TACIANA MIRELY MACIEL HIGINO

**NOVAS PERSPECTIVAS DE FÁRMACOS COM PROPRIEDADE TRIPANOCIDA:
ESTUDOS BIOLÓGICOS DE COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS**

RECIFE

2012

TACIANA MIRELY MACIEL HIGINO

**NOVAS PERSPECTIVAS DE FÁRMACOS COM PROPRIEDADE TRIPANOCIDA:
ESTUDOS BIOLÓGICOS DE COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ – PE para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

RECIFE

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- H638n Higino, Taciana Mirely Maciel.
Novas perspectivas de fármacos com propriedade tripanocida: estudos biológicos de compostos heterocíclicos / Taciana Mirely Maciel Higino. - Recife: s.n, 2012.
84 p. : ilus.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012
Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.
1. Betaína - toxicidade. 2. Betaína - farmacologia. 3. Trypanosoma cruzi - ultraestrutura. 4. Trypanosoma cruzi - efeitos de drogas. 5. Biologia celular. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. II. Título.

TACIANA MIRELY MACIEL HIGINO

**NOVAS PERSPECTIVAS DE FÁRMACOS COM PROPRIEDADE TRIPANOCIDA:
ESTUDOS BIOLÓGICOS DE COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM

Dr^a Janaína Viana de Melo
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Dedico este trabalho aos meus pais Miguel e
Elisabete que sempre estiveram presentes na
minha vida, me ensinado a nunca desistir e
vencer os obstáculos presentes no caminho da
vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força, sabedoria e coragem para sempre seguir em frente

Aos meus pais Miguel e Elisabete, por terem me dado suporte, carinho e conselhos sábios nos momentos em que mais precisei e que para são mim um verdadeiro exemplo de superação.

Aos meus irmãos, Hyane e Miguel pelo apoio, amor e paciência.

A Dr^a Regina Bressan pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr^o Petrônio Figueiras de Athayde-Filho que gentilmente cedeu os compostos avaliados neste trabalho

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular Aline Silva, Amanda Aliança, Andrezza Borges, Divar Fernandes, Jana Sandes, Juliana Aires, Karla Ribeiro, Keicyanne Fernanda e Neyla Alves pela força, conhecimento dividido, amizade e estímulo diário para seguir na vida acadêmica.

Aos meus grandes amigos Amanda Teixeira, Bruna Mazzulo, Elisângela Jesus, Luíza Rayanna, Klécia Marília, Raíssa Wanderley, José Valter (irmão de pais diferentes), Ildnay Brandão e Michele Chianca que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Aos colegas de mestrado que dividiram angústias e alegrias ao longo destes dois anos.

Ao amigo Mineo Nakazawa pelos ensinamentos e conselhos sempre em horas certas.

Aos Doutores Fábio Brayner e Luiz Alves pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Ao programa de pós-graduação em saúde pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, aos professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

“Na longa história da humanidade (e também dos animais) aqueles que aprenderam a colaborar e a improvisar de forma eficaz foram os que prevaleceram.”

Charles Darwin

HIGINO, Taciana Mirely Maciel. **Novas Perspectivas de fármacos com propriedade tripanocida: Estudos Biológicos de Compostos Heterocíclicos**. 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

Os compostos mesoiônicos são moléculas não aromáticas planas, pertencentes à classe das betaínas, os quais apresentam um grande número de atividades biológicas incluindo antibacteriana, anti-inflamatória e anti-protozoária. A despeito do potencial quimioterápico destes compostos, estudos destas moléculas contra o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, ainda são incipientes. No presente trabalho nós avaliamos as atividades tripanocida e citotóxica dos mesoiônicos MECPYR-04, MEC-02, MC-01 e MC-02. Nossos resultados demonstraram que todos os compostos inibiram o crescimento de formas epimastigotas e causaram decréscimo da viabilidade celular em tripomastigotas. Estes compostos também foram efetivos em inibir a infecção de macrófagos e diminuir a viabilidade das formas amastigotas. MECPYR-04 foi o mais efetivo contra todas as formas evolutivas do parasito, entretanto também apresentou alta toxicidade para células de mamíferos, enquanto MEC02, MC-01 e MC-02 apresentaram baixa toxicidade em células de mamíferos e alta seletividade para os parasitas. Apenas MEC-02 e MECPYR-04 aumentaram a produção de NO em macrófagos quando comparados com o controle, sugerindo um potencial imunomodulatório destes compostos. Com objetivo de analisar os efeitos de MEC-02, MC-01 e MC-02 sobre a integridade da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial, células tratadas e controles foram submetidas a marcação com iodeto de propídio e rodamina 123 respectivamente, e analisadas por microscopia confocal. Nenhuma diferença significativa na integridade da membrana foi observada em células tratadas. Estes achados foram confirmados pela microscopia eletrônica de varredura. Apenas MC-01 e MC-02 foram capazes de induzir alterações no potencial de membrana mitocondrial como observado por microscopia confocal e citometria de fluxo. Análise ultraestrutural revelou apenas pequenas alterações em formas tripomastigotas tratadas com MEC-02. Por outro lado, células tratadas com MC-01 e MC-02 apresentaram drástico inchaço da mitocôndria com desorganização ou perda do material da matriz mitocondrial, sugerindo que esta estrutura seja o alvo de ação de MC-01 e MC-02. Todos estes resultados apontam MEC-02, MC-01 e MC-02 como candidatos a fármacos contra a doença de Chagas.

Palavras chaves: 1. Betaína - toxicidade. 2. Betaína - farmacologia. 3. *Trypanosoma cruzi* - ultraestrutura. 4. *Trypanosoma cruzi* – efeitos de drogas. 5. Biologia celular.

HIGINO, Taciana Mirely Maciel. **Novel perspectives of drugs with tripanocidal properties: Biological study of heterocyclic compounds.** Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the *Degree of Master of Public Health* Program- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

Mesoionic compounds are not aromatic planar heterocyclic betaines which present a number of biological activities including antibacterial, anti-inflammatory and antiprotozan. Despite the chemotherapeutic potential of these compounds, studies on these molecules against *Trypanosoma cruzi* are still incipient. In the present work, we evaluated the tripanocidal and cytotoxic activities of the mesoionic compounds MECPYR-04, MEC-02, MC-01 and MC-02. Our results showed that all compounds inhibited the growth of epimastigote and caused considerable loss of trypomastigote forms viability. These compound were also effective in inhibit the macrophage infection and decrease amastigote viability. MECPYR-04 was the most effective against all evolutive forms of parasite, but it was very toxic to mammalian cells, whereas MEC-02, MC-01 and MC-02 presented low toxicity to mammal cells and high selectivity against the parasites. Only MEC-02 and MECPYR-04 increased the production of NO as compared with control cells suggesting an immunomodulatory potential of these compounds. Aiming to evaluate the effects of MEC-02, MC-01 and MC-02 on membrane integrity and mitochondrial membrane potential treated and untreated cells were submitted propidium iodide and Rhodamin 123 staining, respectively and analyzed by confocal microscopy. Our results showed no significant change in the plasma membrane integrity in treated cells. This finding was confirmed by Scanning electron microscopy. Only MC-01 e MC-02 were able to induce changes in the mitochondrial membrane potential as observed by confocal microscopy and flow cytometry. Ultrastructural analysis revealed only slight morphological changes in trypomastigotes treated with MEC-02 as compared with untreated cells. On the other hand, cells treated with MC-01 and MC-02 presented drastic swelling of mitochondrion with disorganization or loss of mitochondrial matrix, suggesting that mitochondrion is a target for MC-01 and MC-02. Taken together our results point MEC-02, MC-01 and MC-02 as drug candidates against Chagas disease.

Key words: 1. Betains- toxicity. 2. Betains- farmacology. 3. *Trypanosoma cruzi* – ultrastructure. 4. *Trypanosoma cruzi* – drugs effect. 5. Cell biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição da doença de Chagas no mundo	18
Figura 2-	Principais vetores responsáveis pela transmissão da doença de Chagas	19
Figura 3-	Apresentações clínicas da fase crônica da doença de Chagas	20
Figura 4-	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 5-	Representação esquemática do ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 6-	Representação esquemática da secção longitudinal da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Quadro 1-	Reações adversas do Nirfutimox e Benzonidazol	32
Quadro 2-	Drogas em desenvolvimento para tratamento da doença de Chagas	37
Figura 7-	Esquema representativo da estrutura básica de um composto mesoiônico	38
Figura 8-	Estrutura química dos principais compostos mesoiônicos	39
Figura 9-	Estrutura química dos compostos mesoiônicos-teste	45
Gráfico 1-	Efeito dos diferentes compostos sobre o crescimento de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Gráfico 2-	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Gráfico 3-	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre o índice de sobrevivência de amastigotas	56
Figura 10-	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a integridade da membrana de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
Figura 11-	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a ultraestrutura de <i>Trypanosoma cruzi</i> como observado através da microscopia eletrônica de Varredura	60
Figura 12-	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) como observado pela microscopia confocal a laser	62

- Figura 13-** Histograma das análises de citometria de fluxo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* 63
- Figura 14-** Efeito dos compostos mesoionicos sobre a estrutura de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* como observado pela microscopia eletrônica de transmissão 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Atividade <i>in vitro</i> dos compostos mesoiônicos contra as formas epimastigotas e tripomastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> , citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade (IS)	53
Tabela 2-	Atividade <i>in vitro</i> dos compostos mesoionicos sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruz</i>	55
Tabela 3-	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a produção de Nitrito em macrófagos	57
Tabela 4-	Análise através da citometria de fluxo dos efeitos dos compostos mesoiônicos sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi_m$) utilizando da sonda fluorescente rodamina 123	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATPase	Adenosina trifosfatase
CC ₅₀	Concentração que causar a perda de viabilidade em 50% das células
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CL ₅₀	Concentração capaz de causar 50% de perda de viabilidade celular
CPY51	Esterol 14- α demetilase/ Citocromo P450
DIC	Contraste Interferencial – Differential Interference Contrast
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNDi	Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
FAZ	Zona de Adesão do Flagelo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G-FINDER	<i>Global Funding of Innovation for Neglected Diseases</i>
GILPs	Glicoinositolfosfolipídios
gRNA	RNA guia
GTPases	Guanidina trifosfatases
HGRT	Hipoxantina guanina fosforibose transferase
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
IL-12	Interleucina 12
IP	Iodeto de propídio
ISE	Inibidores de ergosterol
ISe	Índice de Seletividade
ISo	Índice de Sobrevida
ISE	Inibidores da Síntese de Ergosterol
IV	Índice de Variação
kDNA	DNA mitocondrial
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LPBS	Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NADH-fumarato redutase	Nicotinamida adenina dinucleótido fostato-fumarato redutase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial De Saúde
Rh 123	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucleico
Pi	Fósforo inorgânico
PPi	Pirofosfato inorgânico
Poli P	Polifosfato
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
TcTs	<i>Trypanosoma cruzi trans</i> sialidase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral a
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
V-H+-PPase	Pirofosfatase vacuolar

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Doença de Chagas: Histórico e Considerações gerais	17
1.2	Vias de transmissão	18
1.3	Patologia da Doença de Chagas	19
1.4	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.5	Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.5.1	Superfície celular	24
1.5.2	Microtúbulos subpeliculares	25
1.5.3	Bolsa Flagelar, Citóstoma e Flagelo	26
1.5.4	Mitocôndria e Cinetoplasto	26
1.5.5	Reservosomo	27
1.5.6	Acidocalcisoma	28
1.5.7	Glicossomos	29
1.6	Quimioterapia da doença de Chagas	30
1.7	Compostos mesoiônicos	38
2	JUSTIFICATIVA	41
3	PERGUNTA CONDUTORA	42
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo geral	43
4.2	Objetivos específicos	43
5	MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1	Síntese e preparo das soluções dos compostos mesoiônicos	44
5.2	Animais	45
5.3	Análise da citotoxicidade dos mesoiônicos sobre as células de mamíferos	45

5.4	Manutenção das culturas	46
5.5	Avaliação dos efeitos biológicos dos mesoiônicos em <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
5.6	Produção de óxido nítrico	48
5.7	Análise por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo	48
5.8	Processamento para microscopia eletrônica de varredura	49
5.9	Processamento para microscopia eletrônica de transmissão	50
5.10	Análise estatística	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Citotoxicidade	51
6.2	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre o crescimento de formas epimastigotas	51
6.3	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a viabilidade de formas tripomastigotas	53
6.4	Efeitos sobre a sobrevivência de formas amastigotas intracelulares	54
6.5	Produção de NO	56
6.6	Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a integridade da membrana e potencial de membrana mitocondrial	57
6.7	Visualização do efeito dos compostos mesoiônicos pela microscopia eletrônica de transmissão	64
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A– Parecer do CEUA/CPqAM-FIOCRUZ	84

1 INTRODUÇÃO

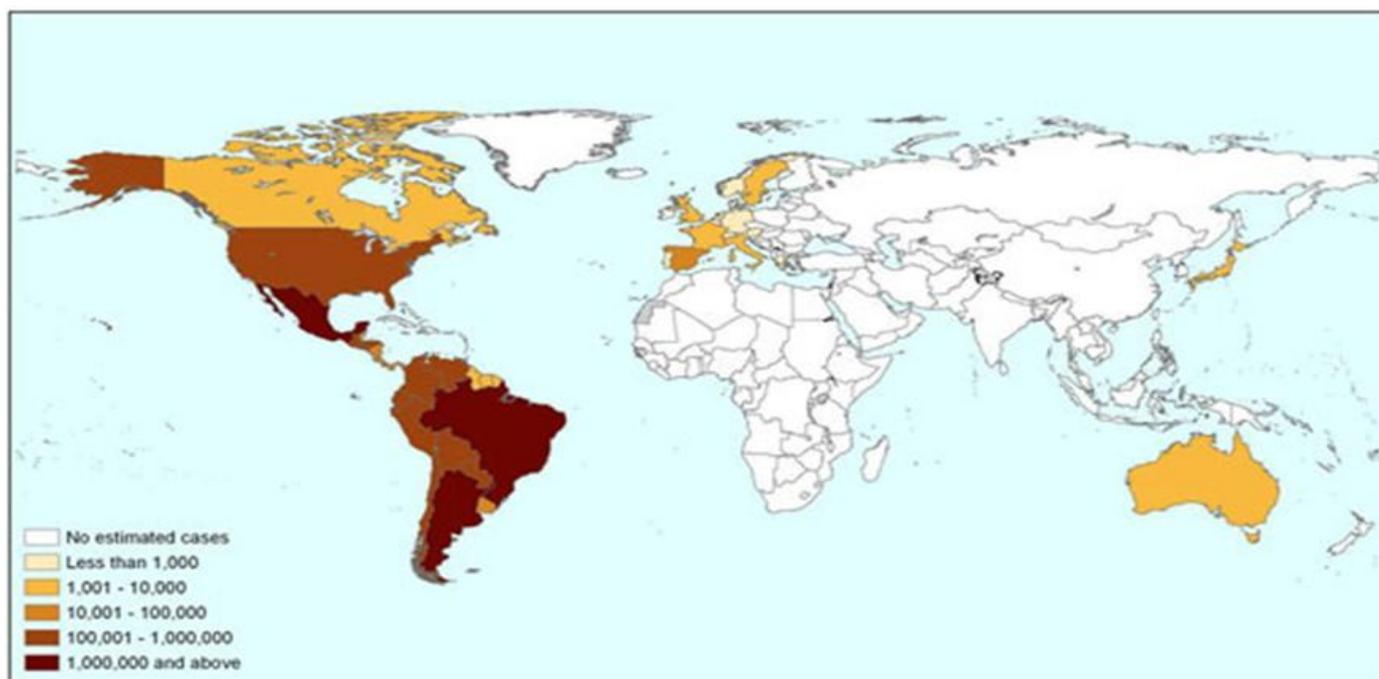
1.1 Doença de Chagas: Histórico e Considerações gerais

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana é uma infecção sistêmica crônica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (RASSI et al., 2010). Estudos paleoparasitológicos identificaram moléculas de DNA de *T.cruzi* em múmias da civilização pré-colombiana, indicando que a doença de Chagas iniciou seu ciclo antroponótico a cerca de 5 mil a.C., quando populações nômades do Chile começaram a invadir o nicho enzoótico primitivo já estabelecido naquela região. Apesar destes achados indicarem a circulação de *T.cruzi* em populações daquele período, um dos primeiros relatos de caso da doença de Chagas foi feito em 1835 por Charles Darwin. É possível que Charles Darwin tenha contraído a doença durante suas expedições pela América do Sul e relatou seu contato com triatomíneos e posteriormente a sintomatologia, compatível com a descrita para a doença de Chagas, podendo esta ter sido a causa de sua morte (PRATA; DIAS; COURA, 2011). Apenas em 1909 a doença viria a ser descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que descreveu detalhadamente todo o ciclo de vida e manifestações clínicas da doença (RASSI JR., et al., 2010).

A partir de 1970 alguns países endêmicos como Brasil, Argentina, Chile, Bolívia e México iniciaram programas nacionais de controle da doença de Chagas, com políticas voltadas para o controle de vetores e melhorias em biossegurança nas transfusões de sangue e transplantes (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Como resultado, estes programas foram responsáveis pelo decréscimo na incidência da doença de 700 mil casos/ ano para 40 mil, e no número anual de mortos, de mais de 45 mil para 12.500 em 2006 (LESCURE et al, 2010). A incidência mundial da doença segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) vem caindo nos últimos anos de 7 para aproximadamente 4 milhões de pessoas (COURA ; VIÑAS, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). A Doença de Chagas acomete cerca de 8 milhões de pessoas do sudeste dos Estados Unidos ao nordeste do Chile e da Argentina, afetando 22 países, e 14 milhões de pessoas sob o risco de infecção (**Figura 1**) (MAYA et al., 2010; OMS, 2007). A doença de Chagas é a maior causa de mortalidade e morbidade na América Latina, um peso para a economia e afeta drasticamente as condições sociais e de trabalho dos pacientes acometidos (MUÑOZ-SARAIVA et al., 2010). Devido ao crescimento

da migração, turismo internacional, transfusão sanguínea, transplantes e transmissão vertical a doença de Chagas é hoje um problema de saúde mundial (SCHMUNIS; YADON, 2010). No Brasil, a estimativa é de que aproximadamente 3 milhões de pessoas estejam infectadas e 5 milhões sob o risco de contrair a doença (PETHERICK, 2011).

Figura 1- Distribuição da doença de Chagas no mundo



Fonte: Médicos Sem Fronteiras (2009).

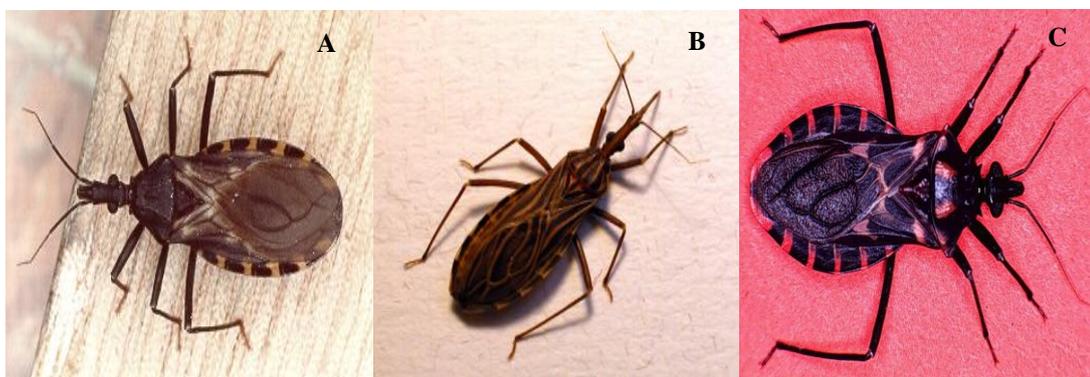
1.2 Vias de transmissão

A principal forma de transmissão da doença de Chagas ainda é a vetorial (SALOMON, 2011). A transfusão sanguínea é o segundo mecanismo mais comum de transmissão da doença (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010), sendo que o risco de infecção após uma transfusão é menor que 10-20% e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasita no sangue do doador, a cepa do parasita e os componentes do sangue transfundidos. O risco parece ser maior em transfusões de plaquetas do que de outros componentes (RASSI JR et al., 2010). A infecção congênita afeta 2-10% dos neonatos nascidos de mães infectadas em regiões endêmicas da Argentina e Bolívia e 1–2% em outros países endêmicos. Estes dois últimos mecanismos são as principais formas de transmissão da doença de Chagas em áreas urbanas e em países não endêmicos (RASSI JR et al., 2010). A

transmissão pela via oral é responsável por surtos em áreas urbanas e regiões onde não há circulação de insetos vetores domiciliados. Recentemente vários surtos da doença de Chagas aguda foram reportados no Brasil e na Venezuela após ingestão de alimentos contaminados (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010; NÓBREGA et al., 2009). Esta via de transmissão é geralmente associada com uma alta concentração parasitária, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa com altos índices de mortalidade (PEREIRA et al., 2009).

O *Trypanosoma cruzi* pode circular entre várias espécies de mamíferos e em cerca de 150 espécies de triatomíneos, mas apenas algumas espécies de insetos possuem potencial para transmitir a doença, tornando-o um dos parasitas mais bem sucedidos. No Brasil, 52 espécies de triatomíneos foram descritas, destas 27 foram encontradas no nordeste Brasileiro, com maior atenção para espécies de três gêneros distintos, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (**Figura 2**), sendo estes vetores importantes para a transmissão entre animais domésticos e o homem nas áreas endêmicas (COURA; DIAS, 2009; RASSI et al , 2010).

Figura 2- Principais vetores responsáveis pela transmissão da doença de Chagas



Fonte: Modificado de Pereira (2011); Modificado de Huebner (2009).

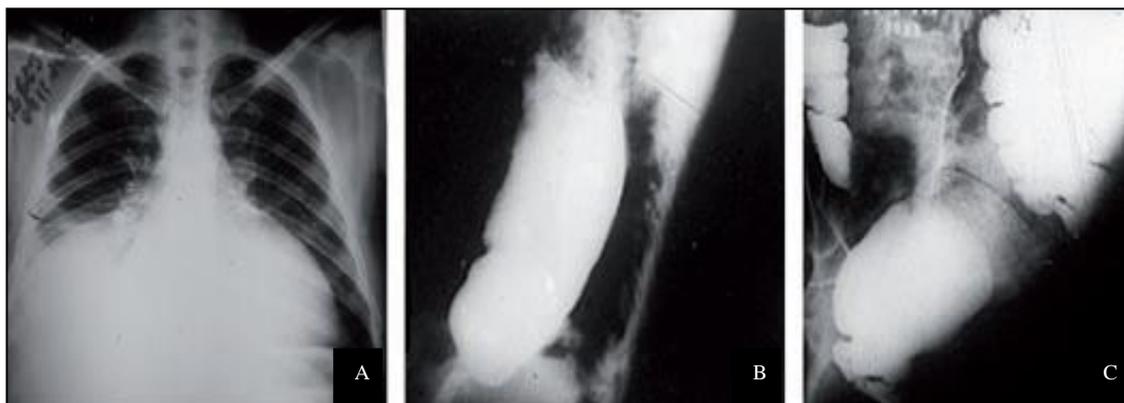
Legenda: (A) *Triatoma*; (B) *Rhodnius*; (C) *Panstrongylus*.

1.3 Patologia da Doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda é na maioria dos casos assintomática e tem duração de 6-12 semanas (CHAGAS, 1909). Nos casos sintomáticos apresentam sinais da inoculação (chagoma de inoculação ou sinal de Romana), febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardites e meningoencefalites nos casos mais severos. A maioria dos pacientes, cerca de 40 a 90%, podem se recuperar e entrar na fase indeterminada da doença, caracterizada pela ausência de

sintomas e danos em órgãos não são detectados (eletrocardiograma e radiografias normais no coração, esôfago e intestino). Desta forma, o diagnóstico nesta fase, restringe-se aos testes sorológicos que são capazes de detectar a presença do parasito no organismo (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Cerca de 30–40% dos pacientes infectados com *T. cruzi* que não receberam tratamento adequado desenvolvem a fase crônica da doença e os sintomas podem aparecer até 30 anos após a infecção. A cardiopatia chagásica, associada à insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita e tromboembolismo periférico, é a manifestação clínica mais importante desta fase devido a sua frequência e severidade. Além da forma cardíaca, 10 -20% dos pacientes podem desenvolver a forma digestiva (megaesôfago e megacólon), ou até mesmo uma associação das formas digestiva e cardíaca (**Figura 3**) (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010).

Figura 3- Apresentações clínicas da fase crônica da doença de Chagas



Fonte: Adaptado de Coura; Viñas (2010).

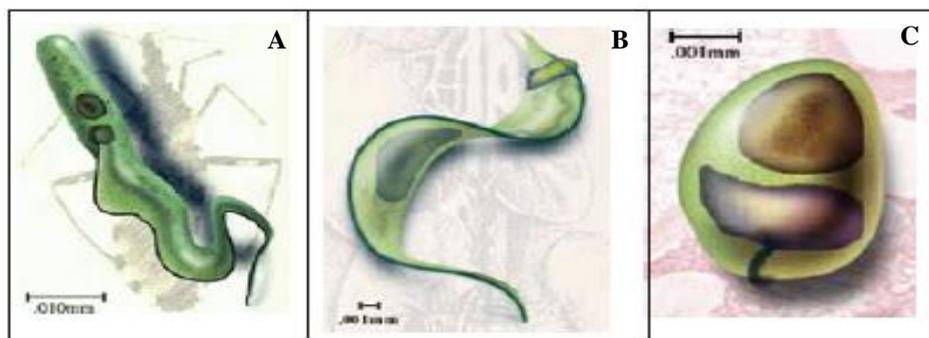
Legenda: (A) Coração de paciente chagásico. (B) Mega-esôfago e (C) Mega-cólon de paciente chagásico.

1.4 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida complexo que requer passagem obrigatória por um hospedeiro invertebrado, o inseto vetor triatomíneo, e um hospedeiro vertebrado. Durante seu ciclo de desenvolvimento o parasita apresenta três formas evolutivas morfológica e funcionalmente distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota (BONNEY; ENGMAN, 2008). Estas formas são caracterizadas morfológicamente pela posição do flagelo, cinetoplasto e núcleo e fisiologicamente pela localização no hospedeiro: (a) Epimastigota: representa a forma multiplicativa no intestino do inseto vetor, possui corpo fusiforme com aproximadamente 20 μm de comprimento e apresenta o cinetoplasto, uma região

especializada onde se concentra o DNA mitocondrial, em forma de bastão anterior ao núcleo (**Figura 4A**); (b) Tripomastigota: constitui a forma infectiva apresentando corpo alongado, o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo, com o flagelo emergindo lateralmente à bolsa flagelar e aderindo ao longo do corpo do parasito, tornando-se livre na região anterior (**Figura 4B**); e (c) Amastigota: constitui a forma intracelular no hospedeiro vertebrado apresenta o corpo arredondado com aproximadamente 2 μm , sem um flagelo aparente e cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo (**Figura 4C**). Os diferentes estágios de desenvolvimento representam uma adaptação ao meio extra e intracelular encontrados nos diferentes hospedeiros (MAYA et al., 2007).

Figura 4- Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

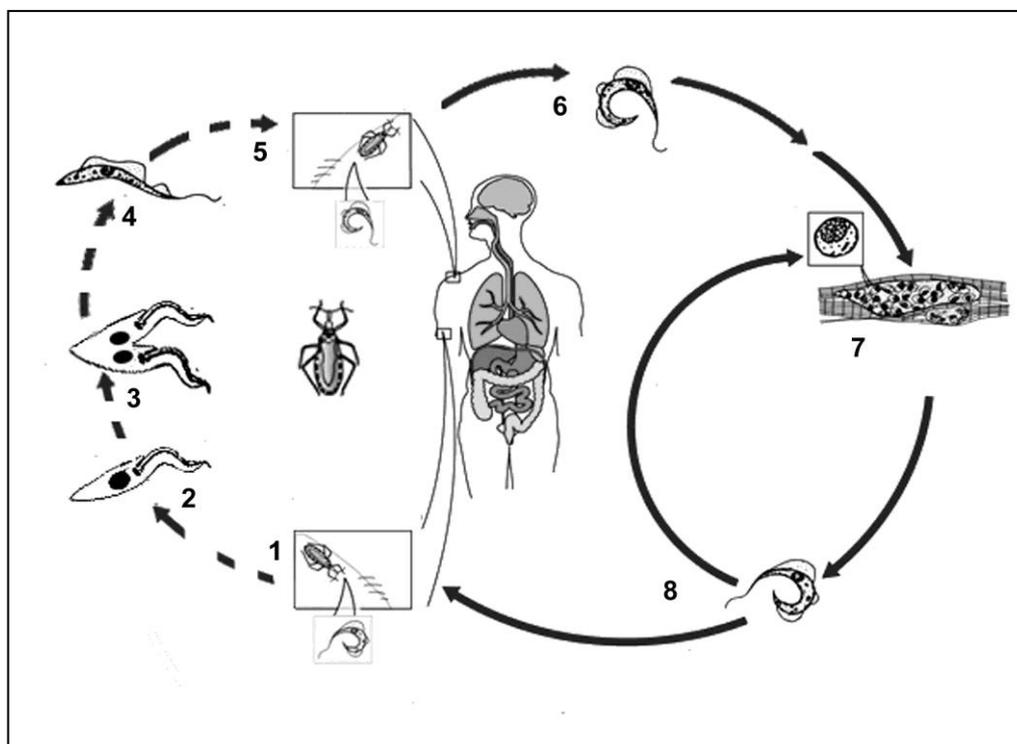


Fonte: Adaptado de Muñoz -Saraiva (2010).

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

O ciclo do parasita se inicia quando o inseto vetor se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado contendo formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, as formas tripomastigotas vão para o estômago do inseto onde a grande maioria é lisada por enzimas digestivas. As formas tripomastigotas remanescentes se transformam em formas epimastigotas (CASTRO et al., 2007). Estas por sua vez migram para o intestino do inseto onde se aderem à membrana intestinal denominada membrana perimicrovilar e dividem-se intensivamente (ALVES et al., 2007). A etapa de adesão é importante para disparar o processo de transformação das formas epimastigotas não infectivas para formas tripomastigotas e envolve a participação de glicoconjugados encontrados na superfície celular do parasito (DE SOUZA et al., 2010). Várias proteínas encontradas na membrana perimicrovilar além de glicoinositolfosfolipídios (GILPs) do parasita parecem estar envolvidos no processo de adesão (ALVES et al., 2007). Na região posterior do intestino e no reto, as formas epimastigotas desprendem-se da membrana intestinal e transformam-se em

formas tripomastigotas metacíclicas. Estas são altamente infectivas para várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos, sendo liberadas junto com os excretas do inseto. A infecção ocorre quando as formas tripomastigotas metacíclicas penetram na mucosa ou pele lesionada durante o repasto sanguíneo (DE SOUZA et al., 2010). Estas formas invadem as células no local da inoculação (ex.: fibroblastos, macrófagos e células epiteliais) através do reconhecimento entre o parasita e a célula do hospedeiro, em um processo que envolve uma ampla variedade de moléculas presentes em ambas as células. Após a internalização, o *T. cruzi* sofre nova diferenciação passando de uma forma longa e fina para uma forma arredondada com um curto flagelo denominada amastigota. Esta forma se divide dentro da célula até a nona geração e então se diferencia novamente em formas tripomastigotas sanguíneas as quais rompem a célula do hospedeiro (LIMA et al., 2010). Após a ruptura, as formas tripomastigotas são liberadas para corrente sanguínea e podem infectar células vizinhas, se disseminar para outros órgãos ou serem ingeridos por outro inseto vetor reiniciando o ciclo (**Figura 5**) (MUÑOZ-SARAIVA et al., 2010).

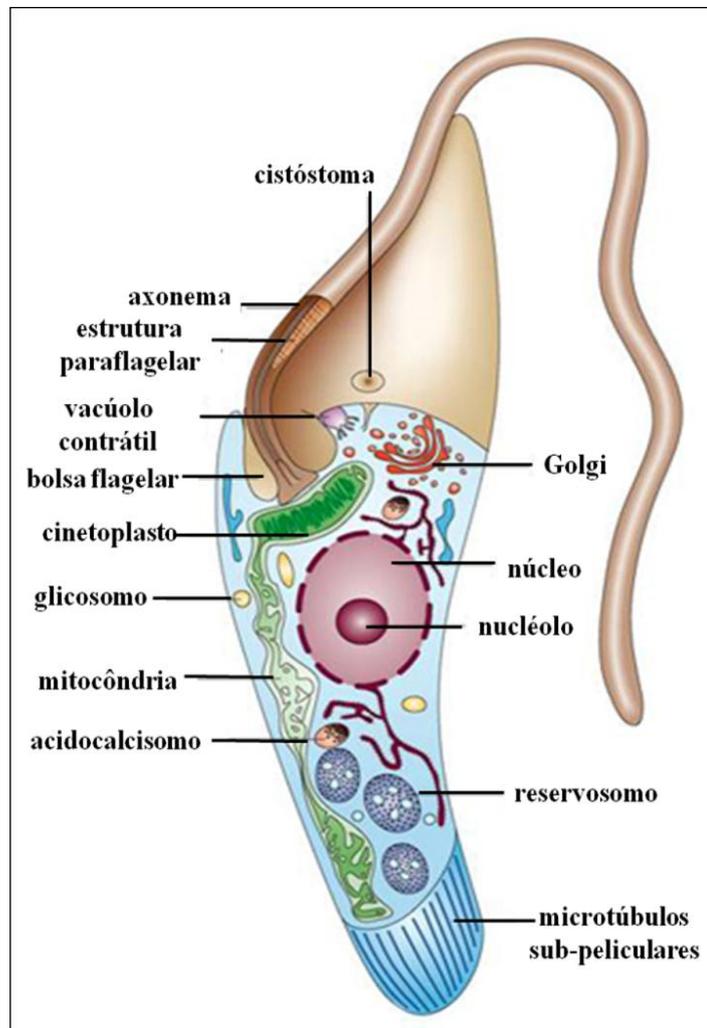
Figura 5- Representação esquemática do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Adaptado de Centers of Disease Control (CDC) (2010)

Legenda: (1) Formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas por insetos triatomíneos durante o seu repasto sanguíneo em indivíduos infectados; (2) No tubo digestivo do inseto se transformam em epimastigotas. (3) Formas epimastigotas se dividem intensamente no estômago do inseto; (4) No final do tubo digestivo os epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas; (5) Estas formas são eliminadas nas excretas do inseto durante novo repasto sanguíneo e (6) são transmitidas para o hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado os tripomastigotas infectam as células e (7) se diferenciam em amastigotas as quais se dividem intensamente no interior das células infectadas. As amastigotas se diferenciam em tripomastigotas rompendo as células e caindo na corrente sanguínea onde (8) podem invadir novas células ou serem novamente ingeridas pelo inseto vetor, fechando assim o ciclo.

1.5 Biologia Celular do *Trypanosoma cruzi*

Sob o ponto de vista da biologia celular, tripanosomatídeos tais como *Trypanosoma cruzi* são bastante interessantes, pois além das organelas características de células eucarióticas superiores tais como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, possuem também estruturas citoplasmáticas que lhes são próprias, como o reservosomo, glicosomos e microtúbulos subpeliculares (**Figura 6**). Processos metabólicos únicos existentes nestas organelas podem ser possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes e seletivas (FIGALGO; GILLE, 2011). Algumas destas organelas serão descritas com maiores detalhes abaixo.

Figura 6- Representação esquemática da secção longitudinal da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Adaptado de Docampo et al. (2005).

1.5.1 Superfície celular

As primeiras observações da ultraestrutura de tripanosomatídeos mostrou que a membrana plasmática do *Trypanosoma brucei* apresentava uma superfície de 15nm de espessura na forma sanguínea. Estudos posteriores mostram que nem todos os tripanosomatídeos apresentavam uma membrana tão fina, como é o caso do *Trypanosoma cruzi* que é coberto por um denso glicocálix (DE SOUZA, 2008). A membrana do parasita varia em densidade e distribuição de partículas intramembranares, que representam as proteínas integrais da membrana, de acordo com o estágio evolutivo do parasito (DE SOUZA, 1999). Além disso, a estrutura da membrana pode variar de uma região para outra ao longo do

corpo celular. A bolsa flagelar e o citóstoma apresentam poucas partículas em comparação com membrana do corpo celular. Outra região diferenciada da membrana do parasito é a zona de ligação do flagelo com o corpo celular, na qual ocorrem especializações da membrana (DE SOUZA, 2007). A membrana plasmática do *T. cruzi* possui um papel importante no processo de infecção sendo responsável pela interação com a superfície celular das células do hospedeiro vertebrado e com a membrana do vacúolo parasitóforo. É também através da membrana celular que o parasita se adere às células epiteliais do intestino do hospedeiro invertebrado permitindo sua sobrevivência e diferenciação como descrito anteriormente (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2009). Os glicoconjugados que compõem a membrana plasmática estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*, porém sua constituição química pode variar de uma forma evolutiva para outra (ALMEIDA et al., 1999; FERGUSON, 1997). Estudos de Camargo et al. (1997 a e b) mostraram que mucinas de formas tripomastigotas podem induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12, e produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de murinos. As mucinas são as principais glicoproteínas envolvidas na modulação do processo de adesão celular e invasão às células do hospedeiro vertebrado (ALMEIDA et al., 1997). Estas proteínas são ricas em resíduos de ácido siálico, os quais são transferidos de glicoproteínas dos hospedeiros por uma sialidase ligada à membrana do parasita denominada de *trans*-sialidase (TcTS) (HARRISON et al., 2011). A sialização das mucinas protege o estágio extracelular do parasito do sistema complemento e da opsonização durante o processo de invasão da célula do hospedeiro (McCONVILLE et al., 2002).

1.5.2 Microtúbulos subpeliculares

O *T. cruzi* não apresenta estruturas citoesqueléticas transcelulares como filamentos e microfilamentos, embora tenha sido identificado actina no parasito. Contudo, o parasito possui um arranjo microtubular que envolve o corpo celular do protozoário e constitui o citoesqueleto associado a membrana denominado microtúbulos sub-peliculares. Estas estruturas estão presentes em todo o ciclo celular e são responsáveis pelas diferentes formas e formatos do parasito durante este ciclo (OKUDA et al., 1999). A associação entre a membrana plasmática e os microtúbulos subpeliculares é tão forte nos tripanosomatídeos que mesmo depois da lise do protozoário estes componentes permanecem associados (DE SOUZA, 2002a).

1.5.3 Bolsa Flagelar, Citóstoma e Flagelo

A maioria das células eucarióticas obtém nutrientes através da endocitose na superfície celular, ao contrário dos tripanosomatídeos que realizam a endocitose em regiões especializadas como o citóstoma e a bolsa flagelar. Em formas epimastigotas e amastigotas do sub-gênero *Schizotrypanum*, o citóstoma é formado por uma invaginação de uma região bem definida da superfície do protozoário localizado na região anterior e próximo a bolsa flagelar, e é responsável por 85% da atividade endocítica. A bolsa flagelar é uma estrutura assimétrica que emerge lateralmente ao flagelo e é ligada ao corpo celular na região anterior do parasito (ROCHA et al., 2010). Estudos mostram que a bolsa flagelar é uma região altamente especializada da superfície dos tripanosomatídeos. Esta estrutura é a única que, ao contrário do citóstoma, não apresenta microtúbulos sub-peliculares associado com a membrana e o revestimento da membrana flagelar difere tanto da membrana que reveste o corpo celular quanto da membrana do flagelo em termos de distribuição de partículas intramembranares e localização de proteínas incluindo algumas enzimas. Além disso, há evidências morfológicas e citoquímicas de que bolsa flagelar é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica (DE SOUZA, 2002b). Na mesma região onde se localiza a bolsa flagelar emerge o flagelo composto de axonema, uma combinação de nove microtúbulos duplos e com um par central e, ao longo a haste paraflagelar, uma estrutura cristalina que é única dos protistas. Durante o ciclo celular, o flagelo apresenta variações de comprimento, ponto de emergência e posição. A região na qual o flagelo se adere ao corpo celular é chamada de zona de adesão do flagelo (FAZ) (ROTUREAU et al., 2009). O sistema protéico da haste flagelar é distinto estruturalmente e imunologicamente dos principais sistemas de filamentos das células eucarióticas, tais como microfilamentos, microtúbulos ou filamentos intermediários (FOUTS et al., 1998; SABORI et al., 1989).

1.5.4 Mitocôndria e Cinetoplasto

Uma característica interessante dos tripanosomatídeos é que eles possuem uma única mitocôndria que se estende por todo o corpo celular enquanto células de mamíferos possuem inúmeras. Assim, a função de uma simples mitocôndria nos tripanosomatídeos é mais vital quando comparada com as várias presentes nas células de mamíferos, já que a presença de

uma quantidade maior destas organelas garante uma compensação da funcionalidade (DE SOUZA, 2002 a; FIDALGO; GILLE, 2011).

No interior da mitocôndria dos tripanosomatídeos reside o cinetoplasto, uma estrutura única na natureza que contém o DNA mitocondrial ou kDNA (HAMMARTON et al., 2007). O kDNA é formado por uma grande rede de DNA que consiste de vários DNAs circulares interconectados formado por dois tipos de moléculas: Maxicírculos e Minicírculos. Os maxicírculos correspondem a 10% do cinetoplasto e são homólogos ao DNA mitocondrial das células eucarióticas. Os maxicírculos são responsáveis pela maquinaria da tradução, codificando RNA ribossomal, e codificação de proteínas que fazem parte da cadeia respiratória. Os minicírculos correspondem a 90% do volume do cinetoplasto e codificam gRNA (RNA guia) que atuam na edição do RNA mensageiro codificado pelo maxicírculo. O RNA mensageiro é criptografado e se torna funcional após edição que consiste na inserção ou deleção de resíduos de uridilato. Por causa da extensa edição de varias transcrições do maxicírculo, muitos gRNA são necessários (FIDALGO; GILLE, 2011; SCHNEIDER, 2001)

1.5.5 Reservosomos

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* possuem vários reservosomos localizados principalmente na região posterior da célula. Esta organela pode variar de forma de acordo com as condições de crescimento e a cepa do parasita, no entanto, de maneira geral ela apresenta uma forma esférica de aproximadamente 0.7 μm diâmetro, envolvida por uma unidade de membrana (DE SOUZA, 2002a). Os reservosomos possuem uma matriz rica em proteínas, na qual várias inclusões eletróluscentes estão imersas (DE SOUZA et al., 2000; SOARES et al., 1987). Estas organelas ácidas contêm cruzipaina, a principal cisteína proteinase do *Trypanosoma cruzi*, e proteínas ingeridas. Por este motivo foi proposto que os reservosomos seriam compartimentos pré-lisossomais (SOARES et al., 1992;). Durante a metaciclogênese, o conteúdo dos reservosomos é massivamente degradado e as organelas desaparecem, sugerindo que o conteúdo armazenado nestas estruturas seja utilizado como fonte de energia para o processo de diferenciação. Os reservosomos também têm sido caracterizados pela presença de proteases sintetizadas pelo parasita bem como pela presença de pequenas GTPases (FIGUEIREDO et al., 2004).

1.5.6 Acidocalcisoma

O acidocalcisoma está presente em bactérias, fungos, algas e protozoários, porém parecem estar ausente em células de mamíferos (RUIZ et al., 2001). Esta organela foi primeiramente descrita em *Trypanosoma brucei* (VERCESI et al., 1994). Nos tripanosomatídeos esta estrutura apresenta forma esférica de aproximadamente 200 nm de diâmetro, sua localização e número varia de uma espécie para outra e até entre as formas evolutivas. Nas formas epimastigotas esta organela se localiza na periferia da célula enquanto que nas formas tripomastigotas o acidocalcisoma está preferencialmente na região anterior. Formas amastigotas apresentam uma quantidade maior de acidocalcisoma, comparado com as outras duas formas, e a estrutura se localiza próxima ao citoesqueleto (DE SOUZA, 2002b). Esta maior quantidade de acidocalcisoma encontrada nesta forma está associado ao fato de que as amastigotas do *T. cruzi* vivem, proliferam e dividem-se em um ambiente com baixa concentração de cálcio, por outro lado, as formas extracelulares habitam um ambiente com alta concentração deste íon, assim, o acidocalcisoma tem função de regular a entrada e saída de cálcio para adequar a célula ao ambiente. Além do cálcio outros íons também foram encontrados nesta organela como, O, Na, Mg, P, K, Zn e Fe (DOCAMPO et al., 1995) A membrana desta organela é rica em glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) e apresenta várias bombas, permutadores e pelo menos um canal (SALTO et al., 2008; SCOTT; DOCAMPO, 2000). O acidocalcisoma tem um importante papel na adaptação e sobrevivência do parasito uma vez que nesta organela se encontram os sistemas responsáveis pela manutenção da homeostase durante todo o ciclo evolutivo.

Entre suas várias funções o acidocalcisoma é responsável pela homeostase de Ca^{2+} e outros íons essenciais para a sobrevivência de parasitas como o *T. cruzi* (DOCAMPO et al., 1995.). O influxo e efluxo de Ca^{2+} é feito através da ATPase de Cálcio. A membrana do acidocalcisoma possui ainda as bombas ATPase de H^+ e a H^+ pirofosfatase vacuolar (V-H⁺-PPase), responsáveis pela regulação da passagem de prótons. A maioria dos tripanosomatídeos apresenta um permutador Na^+/H^+ na sua membrana, contudo o *T. cruzi* não possui este sistema (MONTALVETTI et al., 2004). Ao invés disso, este protozoário possui canais denominados aquaporinas que são responsáveis pela osmorregulação (ROHLOFF et al., 2004). O acidocalcisoma também é o principal compartimento de armazenamento de fósforo como fósforo inorgânico (Pi), pirofosfato inorgânico (PPi) e polifosfato (poli P). Durante o ciclo evolutivo alterações na concentração de poli P foram detectadas. Este dado

sugere o envolvimento do acidocalcisoma na resposta do parasito ao estresse causado pelas mudanças no ambiente. Além disso, a concentração de poli P está envolvido na regulação do pH, armazenamento de energia e pode está relacionado com a virulência de parasitas (MORENO; DOCAMPO, 2009; RUIZ et al., 2001)

1.5.7 Glicossomos

Os glicossomos foram inicialmente descritos como microcorpos e posteriormente, através de testes citoquímicos, observou-se que estas estruturas apresentavam atividade da enzima catalase, semelhante aos peroxissomos de células de mamíferos, em alguns tripanosomatídeos como *Crithidia fasciculata* e *Leptomonas samuelli*. Por esse motivo esta organela foi por algum tempo denominada peroxissomos (DE SOUZA, 2002b). Entretanto, observações posteriores mostram que alguns tripanosomatídeos não apresentavam atividade da catalase (ex.: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania*) (DE SOUZA, 2009). Os glicossomos diferem dos peroxissomos devido à ausência de enzimas peroxissomais típicas (OPPERDOES; BORST, 1977). Desta forma, por alguns tripanosomatídeos apresentarem enzimas peroxissomais, os glicossomos são reconhecidos como membro da família dos peroxissomos (OPPERDOES et al., 1984).

Os glicossomos encontrados em tripanosomatídeos como o *T. cruzi* apresentam a forma globular ou alongada, com aproximadamente 0.2 – 0.3 μm , envolvidos por uma única camada lipídica de membrana com uma matriz homogênea e fracamente densa, e não possuem genoma (DE SOUZA, 2009). Nesta organela ocorre a maioria dos processos glicolíticos, por isso a denominação glicossomos. Além disso, outros processos bioquímicos ocorrem nesta estrutura como: fixação de dióxido de carbono, salvamento de purinas, biossíntese *de novo* de pirimidinas, alongamento de ácidos graxos e biossíntese de isoprenóides e esterol (OPPERDOES, 1987).

1.6 Quimioterapia da doença de Chagas

A doença de Chagas integra um grupo de doenças infecciosas, junto com a leishmaniose, malária e esquistossomose, consideradas negligenciadas, por afetarem principalmente populações de baixa renda. Assim, poucos são os medicamentos disponíveis para o tratamento dessas doenças e o investimento em pesquisa para o desenvolvimento de

novos fármacos e vacinas, este último ainda é limitado (FIDALGO; GILLE, 2010). O Instituto George para a Saúde Internacional publicou um levantamento em 2010 feito pelo Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas (G-FINDER) mostrando que o investimento público/privado em pesquisas para doença de Chagas, doença do sono e leishmaniose é de apenas 4.9% do total do investido em pesquisa na área de saúde (CHATELAIN; IOSET, 2011), um valor muito baixo considerando que 500 milhões de pessoas estejam sob o risco de contrair estas doenças (MORAN et al., 2009). Este fato reflete diretamente no desenvolvimento e produção de novos fármacos visto que de 1975 a 2004 das 1556 drogas aprovadas para o mercado, apenas 21 (correspondente a 1,3%) foram destinadas as doenças negligenciadas (CHATELAIN; IOSET, 2011).

O primeiro composto utilizado para o tratamento da doença de Chagas foi um derivado quinoleico (Bayer 7.602) desenvolvido em 1936 e apresentava uma discreta atividade antiparasitária (OLIVEIRA et al., 2008). Após vários testes com outros compostos, apenas em 1967 foi lançado o Nifurtimox (3-metil-4{(5-nitrofurfurilideno) amino} tiomorfolina-1-1-dióxido) (Lampit[®]), um composto nitroheterocíclico derivado do nitrofurano. O Nifurtimox foi a primeira droga usada para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas (MAYA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; WILKINSON; KELLY, 2009). Esta droga atua através da geração de radicais livres durante o seu metabolismo nas células hospedeiras da seguinte forma: a redução intracelular do nifurtimox gera radical nitro, seguido por um ciclo redox e produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) (DOCAMPO; STOPPANI, 1980). A partir da década de 1980, o Nifurtimox deixou de ser adotado como tratamento para a doença de Chagas no Brasil devido à baixa eficácia e a vários e severos efeitos colaterais (COURA; CASTRO, 2002).

O benzonidazol é também uma droga nitroheterocíclica (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida) desenvolvida por Wineholt e Liebman introduzida em 1972 (OLIVEIRA et al., 2008) para tratamento do mal de Chagas e hoje é o tratamento de escolha adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil. A redução dos metabolitos desta droga é responsável pelo seu efeito tripanocida, pois se ligam covalentemente a macromoléculas. O benzonidazol aumenta a atividade fagocítica, aumenta a taxa de morte do parasito através de interferon γ (ROMANHA et al., 2002) e inibe o NADH-fumarato redutase do *T. cruzi* (TURRENS et al., 1996).

Pode-se observar que o tratamento da doença de Chagas ainda é baseado em compostos quimioterápicos. Contudo, as drogas convencionais, Nifurtimox e Benzonidazol,

estão longe de serem satisfatórias uma vez que apresentam vários e severos efeitos colaterais (**Quadro 1**), baixa eficácia e longo período de tratamento, 90 e 60 dias respectivamente (FIDALGO; GILLE, 2010; CLAYTON, 2010). Neste sentido, a pesquisa por novas terapias se faz necessária visto que nenhuma dessas drogas atende aos preceitos de um bom quimioterápico de acordo com o critério da Organização Mundial de Saúde (OMS): (a) cura parasitológica dos casos agudos e crônicos da infecção; (b) efetividade em uma dose simples ou em poucas doses; (c) acessibilidade ao paciente, baixo custo e fácil obtenção; (d) sem efeitos colaterais ou efeitos teratogênicos; (e) não ter a necessidade de internação para o tratamento e (f) ausência de resistência do agente etiológico (COURA; CASTRO, 2002).

Embora a doença de Chagas tenha sido negligenciada pela indústria farmacêutica e sofrido anos de estagnação em pesquisa e desenvolvimento de novos quimioterápicos, o interesse no estudo e prospecção de novos fármacos com atividade tripanocida tem crescido nos últimos anos e apresentado candidatos bastante promissores (CLAYTON, 2010).

Quadro 1- Reações adversas do Nifurtimox e Benzonidazol

Alterações digestivas
Perda de peso Perturbações gástricas Náusea Vômito
Alterações hematológicas (por hipersensitividade)
Leucopenia Trombocitopenia Agranulocitose
Alterações dermatológicas
Eritematose, erupções sensíveis à luz Dermatite atópica (moderada ou severa) Ocasionalmente, síndrome de Stevens-Johnson, a qual requer suspensão do tratamento
Alterações neurológicas
Polineuropatia dose dependente. Em geral, aparece em doses elevadas são marcadas. Quando a dose de 5mg/kg/dia de benzonidazole é recomendada, 10% - 30% dos pacientes apresentam neuropatias, especialmente no final do tratamento

Fonte: Adaptado de Apt (2010).

É importante ressaltar que os compostos candidatos a quimioterápicos devem ser capazes de atuar sobre as formas clínicas mais relevantes (tripomastigota sanguíneas e amastigotas intracelulares) do *T. cruzi* e ter boa atividade em modelo animal. Além disso, é de grande interesse que os compostos possam ter atividade sobre várias cepas do parasito para assegurar a aplicação em diferentes áreas endêmicas. Um baixo potencial citotóxico em relação às drogas de escolha também deve ser um requisito importante. Por último, o composto deve ser estável e com baixo custo associado a sua produção (BUCKNER; NAVABI, 2010). Vários inibidores de vias metabolicamente importantes tais como: metabolismo de tripanotona, inibidores de cisteínas proteinase, inibidores do metabolismo de fosfolípídeos e ergosterol, inibidores do metabolismo do pirofosfato, da síntese de purinas e pirimidinas têm sido explorados como fontes promissoras de quimioterápicos (APT, 2010).

A tripanotona (N^1 , N^8 - bisglutatispermidina) e a tripanotona redutase são sistemas encontrados apenas em tripanosomatídeos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Estas vias bioquímicas substituem a glutatona e a glutatona redutase, os principais mecanismos do sistema tiol-redox no meio intracelular (URBINA; DOCAMPO, 2003). Diversos compostos derivados de nitrofurano, naftoquinonas e fenotiazida são capazes de inibir estas enzimas (MAYA et al., 2006). Embora estes compostos tenham apresentado atividade tripanocida, têm sido muito difícil determinar qual, entre as várias enzimas envolvidas nesse sistema, é realmente o alvo da droga (URBINA, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* possui uma cisteína proteínase do tipo catepsina denominada cruzipaína, também conhecida como gp51/57 ou cruzaína, a qual é responsável pelas principais atividades proteolíticas durante o ciclo evolutivo do parasito, além de ter papel importante na interação parasito/hospedeiro e estar envolvida na sinalização de Ca^{2+} durante invasão a célula do hospedeiro vertebrado (CAZZULO, 2002; URBINA; DOCAMPO, 2003). Atualmente o composto com atividade mais expressiva como inibidor desta protease e que se encontra em preparação para a fase I de teste clínico é o K777. Este peptídeo da série vinil sulfona se mostrou efetivo apresentando índice de cura ou diminuição da carga parasitária em estudos de prova de conceito. Este composto também foi efetivo contra várias cepas do *T. cruzi* (McKERROW et al., 2009). Compostos não peptídicos baseados em Tiosemicarbazidas e semicarbazidas também estão sendo sintetizados e testados. Porém, a estrutura que se destaca entre a classe dos não peptídicos é 1,2,3-triazol baseado em uma tetrafluorofenoximetil cetona, a qual demonstrou atividade supressiva em modelo murino infectado com *T. cruzi* sem efeito tóxico aparente (BRAK et al., 2010). Embora estes compostos sejam os que apresentem resultados mais promissores, outras classes de compostos não peptídicos estão sendo testados. Estes estudos mostraram que a cruzipaína é um importante alvo para ação de quimioterápicos, porém o potencial dos inibidores peptídicos não está bem estabelecido e o desenvolvimento de compostos não peptídicos ainda é recente (URBNINA, 2010).

Os inibidores de fosfolípeos foram desenvolvidos inicialmente para tratamento de câncer, uma vez que estas substâncias são capazes de inibir o crescimento do tumor (MAYA et al., 2006). Alquil-lisofosfolipídeos (ALP) são análogos sintéticos dos lisofosfolipídeos, os quais têm se mostrado efetivos contra o *T. cruzi* em teste *in vitro* e *in vivo* (APT, 2010). A Miltefosina, um dos representantes da classe destes inibidores, é utilizada atualmente para o tratamento da leishmaniose visceral (APT, 2010). O mecanismo de ação da Miltefosina é

através da inibição da biossíntese de fosfatidilcolina e esfingomielina, o que pode disparar o processo de morte celular por apoptose (MAYA et al., 2006). Estudos recentes mostram que esta droga apresenta atividade em 11 cepas do *T. cruzi*, porém estudos *in vivo* não foram descritos. Outros dados apontam que a Miltefosina teve atividade supressiva em camundongos infectados com o parasito, todavia não apresentou atividade curativa (BUCKNER; NAVABI, 2010). Antes de ser validada como tratamento da doença de Chagas, a Miltefosina deve antes passar por testes clínicos para comprovar sua eficácia contra a doença principalmente porque esta droga é teratogênica e a transmissão congênita do *T. cruzi* é uma via de transmissão relevante atualmente (APT, 2010).

Previamente foi discutida uma estrutura denominada acidocalcisoma, organela responsável por entre outras funções armazenar fósforo, e a importância deste sistema para a sobrevivência do parasito. O pirofosfato inorgânico (PPi) e outros fosfatos, como os de cadeia curta, tri, tetra ou polifosfatos, são os que possuem maior energia entre os compostos fosfatos encontrados nos tripanosomatídeos (APT, 2010). Estudos têm demonstrado que compostos bisfosfonatos, estruturas não metabolizadas análogas ao pirofosfato, podem se acumular nos acidocalcisomas e inibir enzimas envolvidas nas reações orgânicas e inorgânicas que dependem do pirofosfato. Tais alvos incluem enzimas como a farnesil-pirofosfato sintase, envolvida na biossíntese de esteróides (GARZONI et al., 2004; MONTALVETTI et al., 2001). Drogas contendo bisfosfonatos como o pamidronato, alendronato e risedronato, os quais são utilizados atualmente na medicina para tratamento de disfunção da reabsorção óssea, apresentaram efeito sobre a proliferação de formas amastigotas. O risedronato foi capaz de reduzir a infecção em camundongos na fase aguda da doença e reduzir drasticamente a parasitemia e as formas amastigotas. Esta droga atua sobre a enzima farnesil-pirofosfato sintase (GARZONI, 2004). Embora apresente boa atividade sobre o parasito, drogas a base de bisfosfonatos está associado à necrose óssea, efeito observado a longo-prazo (APT, 2010). Além do mais, o potencial uso antiparasitário destas drogas deve ser avaliado em relação a formulações farmacológicas e propriedades farmacocinéticas que se adequam a esta aplicação (URBINA, 2010).

Os tripanosomatídeos são deficientes na síntese *de novo* de purinas, para suprir esta deficiência, estes protozoários precisam capturar estes componentes essenciais para seu crescimento em meio ou na célula de mamíferos. A principal enzima envolvida neste sistema bioquímico é a hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPGRT) (URBINA; DOCAMPO, 2003). Acreditava-se que o alopurinol, um inibidor da xantina oxidase utilizado

para o tratamento da gota, poderia ser um candidato a quimioterápico tendo como alvo essa via biossintética. Em tripanosomatídeos, deficientes em xantina oxidase, o alopurinol atua como um análogo à purina e é incorporado ao DNA do parasito através da HPGRT, este mecanismo acarreta na quebra da síntese de RNA e proteínas (PAULINO et al., 2005). Inicialmente estudos mostraram que esta droga era ativa em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda, porém houve diferenças na susceptibilidade das várias cepas do parasito (URBINA; DOCAMPO, 2003). Além disso, um estudo multicêntrico realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na Argentina, Brasil e Bolívia mostrou que o alopurinol não foi capaz de controlar a parasitemia (RASSI et al., 2007). Embora o HPGRT seja um alvo interessante, pouco tem sido o interesse em desenvolver inibidores capazes de atuar nesta via (URBINA, 2010).

Diversos compostos azólicos têm sido usados com sucesso na medicina. Estas estruturas, junto com outros compostos heterocíclicos nitrogenados, pertencem ao grupo de drogas que atuam como inibidores da síntese de ergosterol (ISE) (APT, 2010). O *T. cruzi* exige esteróis específicos para a viabilidade celular e proliferação em todas as fases do ciclo de vida. Desta forma, a via biossintética do ergosterol e a principal enzima envolvida neste processo, C14 α -esterol demetilase (CYP51), têm sido estudadas como possíveis alvos para quimioterápicos (URBINA; DO CAMPO, 2003; URBINA, 2010). Os ISEs disponíveis atualmente no mercado são indicados para tratamento de doenças causadas por fungos (URBINA, 2002). Vários estudos têm apontando o uso destas drogas contra o *T. cruzi*, uma vez que este parasito e os fungos possuem em comum a importância da via biossintética do ergosterol. Dentre as drogas estudadas encontram-se o cetoconazol, itraconazol ou terbinafina e fluconazol que, embora tenham demonstrado efeito supressor contra o parasito da doença de Chagas, não foram capazes de impedir a progressão da doença (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Novos derivados triazólicos estão sendo estudados, dentre estes o posaconazol foi o mais promissor induzindo cura parasitológica em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda e crônica da doença. Além disso, esta droga obteve efeito em cepas resistentes aos nitrofuranos e nitroimidazóis em modelo murino, mesmo quando testados em animais imunossuprimidos (URBINA, 2002). O tratamento com o posaconazol associado ao amiodarona, uma droga anti-arritmica, apresentou atividade sinérgica contra o *T. cruzi* em testes *in vitro* e *in vivo* (URBINA, 2002). O primeiro uso do posaconazol foi feito na Espanha em uma paciente de 44 anos infectada com *T. cruzi* e que sofria lúpus eritematoso. O

tratamento com o posaconazol levou a negatificação dos testes sorológicos da paciente (CLAYTON, 2010). Os resultados obtidos a partir dos estudos de Urbina e colaboradores junto com o caso da Espanha levaram o posaconazol a fase II do teste de triagem (CLAYTON, 2010; URBINA et al., 2002).

Em relação ao amiodarona, comumente usado em pacientes com cardiopatia chagásica, observou-se que esta droga apresenta atividade tripanocida tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BENAIM et al., 2006). Este efeito possivelmente se deve a um mecanismo de ação duplo, no qual a droga age interferindo na homeostase de Ca^{2+} e bloqueando a biossíntese *de novo* do colesterol como observado em *Leishmania mexicana* (SERRANO-MARTIN et al., 2009).

O ravuconazol, outra droga antifúngica, também apresentou atividade contra o *T. cruzi* em testes *in vitro*, porém não houve resultados promissores em testes *in vivo* no modelo murino e canino (URBINA et al., 2003 a e b). Sugeriu-se então que a farmacocinética desta droga fosse inadequada para estes modelos. Embora os testes *in vivo* não tenham apresentado bons resultados, a concentração da droga capaz de inibir a proliferação de formas amastigotas foi de 1000 – 5000 vezes menor que os níveis aceitáveis para a administração em humanos (ANDES et al., 2003). A partir disto, a Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) fechou acordo junto com empresa farmacêutica japonesa Eisai para o desenvolvimento do E12-24, uma pró-droga do ravuconazol solubilizada em água, para o tratamento da doença de Chagas (URBINA, 2010)

Outro derivado triazólico bastante promissor é o TAK-187 que possui um largo espectro de atividade antifúngica. Este composto também apresentou atividade tripanocida *in vivo* e *in vitro*, cura parasitológica em camundogos em ambas as fases da doença e mostrou eficácia contra cepas resistentes aos tratamentos atualmente adotados (URBINA et al., 2003 a e b). Estudos recentes mostraram que o TAK-187 foi capaz de prevenir danos cardíacos em testes realizados em modelo murino quando comparado ao benzonidazol (CORRALES et al., 2005).

Apesar de novos fármacos estarem em fase avançada (**Quadro 2**) de teste é necessário que mais compostos sejam descobertos e estudados. Segundo James McKerrow, pesquisador responsável pelo desenvolvimento do K777, na história do desenvolvimento de drogas, mais de 50% dos candidatos considerados promissores falham quando testados em humanos. Desta forma, novas gerações de drogas têm que estar prontas para serem testadas e assim evitar anos de estagnação em pesquisa e desenvolvimento (LESLIE, 2010).

Quadro 2- Drogas em desenvolvimento para tratamento da doença de Chagas

Nome da droga/ companhia	Uso atual	Potencial uso na doença de Chagas	Alvo/ Mecanismo	Estágio de teste
Benzonidazol (LAFEPE)	Usado na rotina para a fase aguda e crônica recente	Prevenção da cardiopatia crônica	Modificação covalente de macromoléculas; dano ao DNA	Fase III randomizado, controle placebo, triagem multicentro para cardiopatia crônica da doença de Chagas (BENEFIT)
Posaconazol (Merk & Co., Inc.)	Antifúngico	Todos os estágios da doença	CYP51 na via biossintética do ergosterol	Fase II de triagem planejada na Espanha; planos de triagem também anunciado pelo Schering Plough (antes da fusão com Merk & Co., Inc.)
E12-24 (Eisai, Japão)	Pró-droga do anti- fúngico ravuconazol, ainda não aprovado.	Todos os estágios da doença	CYP51	Fase I de triagem completada; Fase II de triagem planejada na Bolívia (com potencial de extensão para a Espanha; DNDi)
Tak-187 (Takeda, Japão)	Anti-fúngico, ainda não aprovado	Todos os estágios da doença	CYP51	Fase I de triagem completada
Amiodarona (sem patente) e Dronedarona (Sanofi-aventis)	Arritmia cardíaca	Fase Crônica	Ruptura da homeostase de cálcio do parasito e inibição da biossíntese de ergosterol	Frequentemente utilizado como anti-arritmico em pacientes da doença de Chagas; atividade anti-tripanicida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
K777 (Sandler Center for Drug Discovery)	Ainda não aprovado	Novo uso contra a doença de Chagas	Cruzipaína	Em preparação para a fase I segura de triagem

Fonte: Adaptado de Clayton (2010).

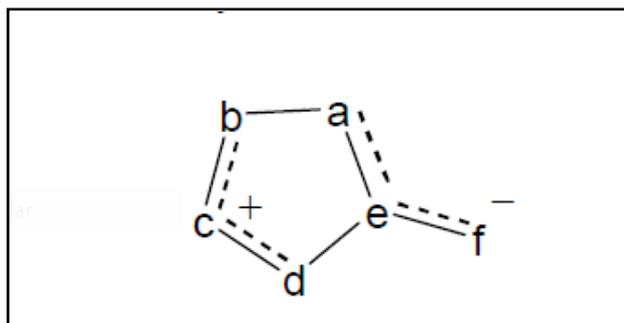
Legenda: BENEFIT, Benzonidazol Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis; CYP51, sterol 14 α -dimetilase; DNDi, Drugs for Neglected Disease Initiative.

1.7 Compostos mesoiônicos

Os compostos heterocíclicos possuem enorme potencial como moléculas promissoras para o desenvolvimento de fármacos. Muitos destes compostos já são fármacos amplamente utilizados na clínica, apresentando atividades farmacológicas diversificadas, tais como: antihipertensivo (losartan); antiviral (ribavirina); antitumoral (carbamato de fluorouracila); antifúngica (posaconazol); antiinflamatória e analgésica (dipirona); antiprotozoária (metronidazol); e antimicrobiana (benzilpenicilina) (MELO, 2006).

Os compostos mesoiônicos apresentam característica estrutural bastante peculiar e são considerados um grupo distinto de heterocíclicos pertencentes à classe das betaínas, esta classe apresenta uma amina na cadeia cíclica e não apresentam um anel aromático (BADAMI, 2006). Estes compostos possuem uma estrutura planar com pelo menos uma cadeia lateral na qual o α -átomo está sempre no plano do anel e com momento dipolo na ordem de 5D. Os elétrons estão deslocalizados sobre duas regiões separadas por ligações simples. Uma região que inclui o α -átomo da cadeia lateral está associada com uma carga negativa π , enquanto a outra cadeia lateral está associada a uma carga positiva π . A figura 7 corresponde a esta definição (LIRA et al., 2002), onde a,b,c,d, e f são normalmente C, N, O, S ou Se

Figura 7 – Esquema representativo da estrutura básica de um composto mesoiônico

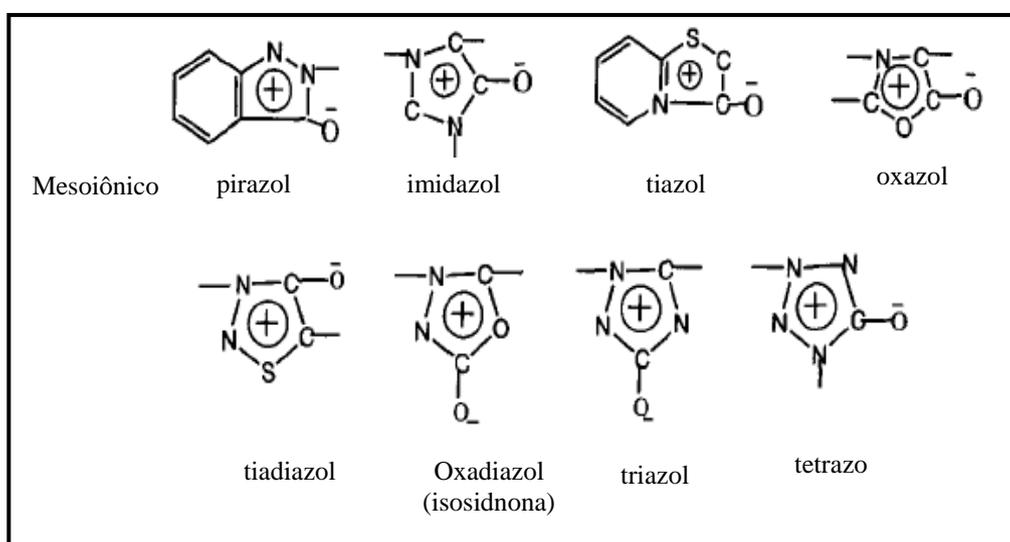


Fonte: Lira et al (2002).

A ligação entre seus membros não são satisfatoriamente representados por nenhuma estrutura covalente ou dipolar, mas apenas como híbridos de estruturas polares, e possuem um sexteto de elétrons. O termo mesoiônico (mesomérico + iônico) foi designado por Bark e Ollis (1957) para indicar este caráter iônico peculiar de tais heterocíclicos. Além destas características, os mesoiônicos possuem 2 ou mais heteroátomos com um heteroátomo

exocíclico (oxigênio, nitrogênio e enxofre). A maioria dos mesoiônicos heterocíclicos é de origem sintética e possuem um anel heterocíclico que pode ser: pirazol, imidazol, tiazol, oxazol, tiadiazol, oxadiazol, triazol ou tetrazol (**Figura 8**) (BADAMI, 2006). O potencial valor dos compostos mesoiônicos como substâncias biologicamente ativas está no seu caráter planar, seu tamanho relativamente pequeno e na variação de densidades de cargas eletrônicas no anel heterocíclico, 1 exocíclica, assim atribuindo propriedades anfifílicas (ATHAYDE-FILHO et al., 2000).

Figura 8- Estrutura química dos principais compostos mesoiônicos



Fonte: Adaptado de Badami (2006).

Compostos mesoiônicos são objetos de pesquisas há quase treze anos (ATHAYDE - FILHO et al., 1996). O grande interesse nessa classe de heterocíclicos são os relatados da literatura sobre o grande número de aplicações biológicas e tecnológicas. Os compostos mesoiônicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, antimicrobiana (ATHAYDE-FILHO et al., 1999), antineoplásica (GRYNBERG et al., 1992, DUNKLEY; THOMAN, 2003), antidepressivo (ANDERZHANOVA et al., 2001), anticonvulsivante, antiepilepsia (VIDA et al., 1975; CORTES et al., 1985), antiarrítmico cardíaco, esquistossomicidas (WERBEL et al., 1977), atividade antitumoral (PENG et al., 1975). Alguns dos efeitos destes compostos estão relacionados com a presença de grupos substituintes específicos no anel ou a habilidade destes compostos em liberar óxido nítrico de suas estruturas moleculares (SNEFF-RIBEIRO et al., 2004). Estudos *in vivo* também mostraram que os compostos 3-benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidina-

4-onas demonstraram baixos níveis de toxicidade quando administrados em altas doses em camundongos (ALBUQUERQUE et al, 2005).

Apesar do potencial dos compostos mesoiônicos como moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos, estudos sobre sua atividade em tripanosomatídeos parasitas ainda são incipientes (RODRIGUES et al., 2009). Nesse sentido nosso trabalho avaliou *in vitro* a atividade de compostos heterocíclicos mesoiônicos sobre as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*.

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* afeta cerca de 7 milhões de pessoas na América Latina, e mais de 14 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção. Atualmente o tratamento utilizado para esta doença é o benzonidazol (Rochagan®, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida), tendo em vista que o Nifurtimox® teve sua produção descontinuada. Estas drogas possuem eficácia questionável, vários e severos efeitos colaterais, além de ter atividade mutagênica e carcinogênica. Por este motivo, novas drogas vêm sendo testadas para o tratamento da tripanosomíase. Ainda, devido ao desinteresse da indústria farmacêutica, as pesquisas por novos fármacos nos Centros Brasileiros de Ensino e Pesquisas tem se tornado crescente e assim sendo a síntese orgânica se torna uma ferramenta que contribui cada vez mais na descoberta de novas moléculas. Neste ponto de vista é de grande relevância o investimento na área de síntese e planejamento de novas moléculas com perspectivas farmacológicas. Os compostos heterocíclicos, por sua vez, são as maiores fontes de fármacos sintéticos e estão envolvidos em diversos tipos de reações químicas. Sua importância está relacionada à possibilidade da introdução de átomos ou da mudança de heteroátomos, ou ainda por condensar ao anel novos grupos substituintes, o que lhes conferem novas e diferentes propriedades biológicas. Estas estruturas pertencem a uma classe de moléculas notáveis por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas comprovadas como, por exemplo, atividades antimicrobianas, antineoplásicas, antidepressivas, atividades fungicidas, bactericidas, hipoglicemiantes, antiinflamatórias, anticarcinogênicas antivirais, atividades antiulceras, hipotensoras, ansiolítica, entre outras.

Assim, por ainda não existirem compostos que atuem com mais seletividade sobre estes parasitas sem causar tantos danos ao homem, o presente trabalho avaliou tripanocida de novos heterocíclicos derivados de aminoácidos e heterocíclicos piperínicos-derivados.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os efeitos biológicos dos compostos heterocíclicos mesoiônicos sobre as diversas formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e células de mamíferos (macrófagos)?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar biologicamente novas séries de compostos mesoiônicos candidatos a fármacos com atividade tripanocida.

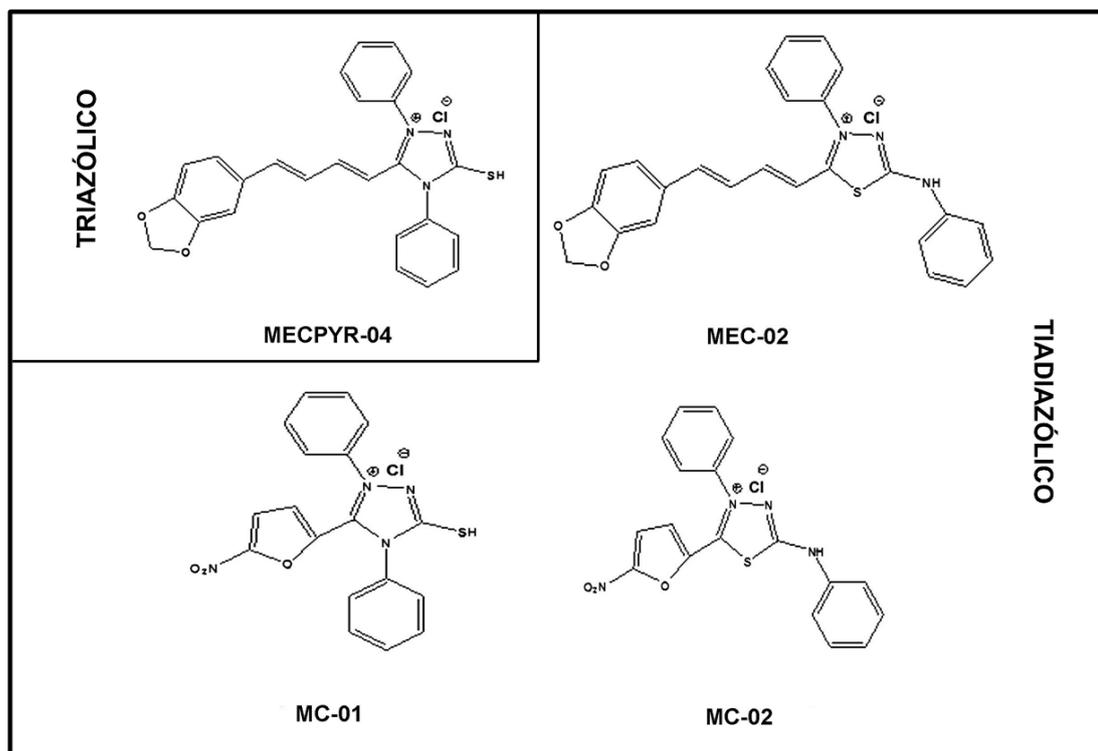
4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito dos compostos mesoiônicos sobre o crescimento de formas epimastigotas e sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- b) Avaliar o potencial citotóxico dos compostos mesoiônicos frente as células de mamíferos;
- c) Avaliar *in vitro* o índice infecção e de sobrevivência de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com os compostos mesoiônicos;
- d) Estabelecer o índice de seletividade dos diferentes compostos frente às formas tripomastigotas e amastigotas em relação às células de mamífero;
- e) Identificar através de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura os possíveis alvos intracelulares de ação dos compostos em *T. cruzi*;
- f) Avaliar os efeitos dos compostos sobre a integridade da membrana e sobre o potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi* através da microscopia confocal e citometria de fluxo.
- g) Analisar o efeito dos compostos mesoiônicos sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Síntese e preparo das soluções dos compostos mesoiônicos

As pesquisas de síntese orgânica foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS/UFPB) pelo Dr^o Petrônio Figueiras de Athayde-Filho. A caracterização dos compostos foi feita por métodos físicos usuais tais como Espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C . Os compostos foram sintetizados baseados na reação do composto 1,4-difeniltiosemicarbazida com um cloreto ácido. O composto MECPYR-04 e MEC-02 foram sintetizados usando o cloreto ácido derivado do ácido piperínico. O MECPYR-04 é do sistema triazólico-tiolato recristalizado em piridina, enquanto o MEC-02, MC-01 pertencem ao sistema tiadiazólico-aminada e MC-01 pertencem ao sistema triazólico-tiolato. Os compostos mesoiônicos foram diluídos em DMSO a uma concentração de 10 ou 50 mg/mL, dependendo da solubilidade dos compostos. As soluções foram então dissolvidas em diferentes concentrações em meio de cultura de modo que a porcentagem de DMSO nas maiores concentrações testadas foi inferior a 1%, concentração não tóxica para as células. As soluções estoques foram mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz até o uso.

Figura 9- Estrutura química dos compostos mesoiônicos-teste

Fonte: Cortesia de Athayde- Filho (2012)

5.2 Animais

Camundongos Balb/c foram adquiridos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL)-FIOCRUZ e usados para obtenção de macrófagos peritoneais. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA- FIOCRUZ L-001/08).

5.3 Análise da citotoxicidade dos mesoiônicos sobre as células de mamífero

As análises de citotoxicidade foram realizadas segundo o protocolo estabelecido por Mosmann (1983) com algumas alterações. Este teste é baseado na redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolona) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por enzimas mitocondriais de células viáveis produzindo um cristal púrpuro denominado cristal de formazan. Assim, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c

foram coletados através de lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB a 4°C. Após a coleta, as células foram contadas e a concentração ajustada para 10^6 células/ml. Em seguida as células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações dos compostos mesoiônicos por 48 horas. Após este período, o meio RPMI contendo a droga foi substituído por RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB, adicionando-se então 10µL de MTT. As culturas foram incubadas por 3h em estufa de 37°C à 5% de CO₂ na ausência de luz. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet solubilizado com 100 µL de DMSO. O precipitado derivado da redução de MTT foi determinado espectofotometricamente a 595nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Poços contendo apenas MTT e DMSO foram utilizados como branco. A concentração capaz de causar efeito citotóxico em 50% das células (CC₅₀) foi estimada através de regressão linear. A partir da CC₅₀ foi determinado o índice de seletividade (ISe), o qual informa o quanto um composto é tóxico para o parasita em relação as células do hospedeiro, através da razão entre a CC₅₀ e a DL₅₀ de tripomastigota ou a IC₅₀ de amastigota.

5.4 Manutenção das culturas

Formas epimastigotas (cepa Dm28 c) foram mantidas a 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas de 3 dias (fase exponencial). Para obtenção das formas tripomastigotas, 5 ml de cultura de células vero de 2 dias foram infectadas com 100 µL de suspensão de tripomastigotas (cepa Y) concentradas a 10^6 células/ml. Esta cultura foi mantida em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) em estufa a 37° C e 5% de CO₂ até que formas tripomastigotas fossem observadas no sobrenadante. Formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da inoculação de tripomastigotas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 37° C em estufa a 5% de CO₂ e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos mesoiônicos conforme descrito abaixo.

5.5 Avaliação dos efeitos biológicos dos mesoiônicos em *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas coletadas na fase log de crescimento (2×10^6 parasitas/mL) foram incubadas em placas de 24 poços contendo meio LIT suplementado com 10% de SFB, por 72 horas na presença ou ausência de diferentes concentrações dos mesoiônicos-testes (0.47 – 120 $\mu\text{g/mL}$). O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica e as contagens feitas em câmara de Neubauer. A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada após 48 horas de cultivo por análise de regressão linear através do software SPSS 18.0. Cada teste foi realizado em 3 experimentos independentes em triplicata.

Formas tripomastigotas (1×10^7 parasitas/mL), mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) como descrito acima, foram incubadas por 24 horas em placas de 96 poços na presença ou ausência dos compostos mesoiônicos (0.47 – 60 $\mu\text{g/mL}$). A CL_{50} (concentração que causa 50% de perda de viabilidade dos parasitas) foi obtida da mesma forma que a IC_{50} para formas epimastigotas. Os testes foram realizados em 3 experimentos independentes em triplicata.

Para avaliar o efeito dos compostos sobre as células infectadas com *T. cruzi*, primeiramente macrófagos peritoneais de camungongos Balb/c mantidos em meio RPMI - 1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB foram semeados em placas de cultivo de 24 poços (10^6 cel/mL), contendo lamínula de vidro de 13mm, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após 1 dia de cultivo, as culturas foram lavadas e infectadas com formas tripomastigotas na proporção de 10:1 parasita/célula. Após 3 horas de interação, os parasitas não internalizados foram retirados por lavagem com meio RPMI e incubados em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos mesoiônicos (0.357– 15 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas de tratamento, o meio foi retirado e os poços lavados 2 vezes com PBS (tampão fosfato-salino). Em seguida os macrófagos foram fixados por 5 minutos em metanol e corados por 20 minutos com Giemsa (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) (3 gotas de Giemsa para cada 2 ml de água destilada). Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada, deixadas secar e montadas em lâminas com Etellan (Merk KGaA, Darmstadt, ALE). A concentração capaz de inibir em 50% a infecção dos macrófagos por formas amastigotas (IC_{50}) foi determinada a partir da observação direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares através de microscopia óptica de campo claro. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando-

se o número de amastigotas pelo número de células infectadas. Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle.

5.6 Produção de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) apresenta um importante papel na resposta imune contra o *Trypanosoma cruzi* uma vez que é um dos principais mecanismos responsáveis pela eliminação da forma intracelular deste parasito. Em culturas de células, o NO liberado pelas células é rapidamente convertido em derivados de nitrogênio, dentre estes o nitrito é o mais estável e pode ser mensurado (PINHO et al., 2011). A fim de analisarmos o efeito dos diferentes compostos mesoiônicos na produção de óxido nítrico por macrófagos, utilizamos teste de quantificação de nitrito através do reagente de Griess. Macrófagos peritoneais de camundongos Blab/c foram isolados como previamente descrito para a realização do teste de citotoxicidade. As células isoladas foram contadas e as suas concentrações ajustadas para 10^6 células/ml, semeadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 por 24 h. Após o período de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos mesoiônicos (0,47 - 60 $\mu\text{g/ml}$) por 48h nas mesmas condições de cultivo. Após o tratamento, 100 μl do sobrenadante da cultura de macrófagos de cada situação foram incubados com 100 μl do reagente Griess (1% sulfanilamida/ 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto/2.5% H_3PO_4) a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida a 490nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad[®], Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

5.7 Análise por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

Para análise do possível efeito das drogas sobre a membrana plasmática e mitocôndria dos protozoários foram utilizados os marcadores iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) e rodamina 123 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA), respectivamente. Formas epimastigotas foram incubadas na ausência ou presença dos compostos na concentração correspondente IC_{50} e $2x \text{IC}_{50}$, por 48 horas. Alíquotas de 1 mL das culturas foram então centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas 3 vezes em PBS e concentradas em um volume final de 0,5 ml de PBS. Em seguida as células foram incubadas

com 30 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de rodamina 123 por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem das células marcadas com rodamina 123 em PBS por 3 vezes. As células foram então colocadas em placas de cultivo mattek (Matteck Co. USA) e observadas diretamente ao microscópio confocal Leica SPII-AOBS utilizando o laser HeNe 488 nm. As imagens foram adquiridas e processadas através do software Leica Lite 2.0. Adicionalmente, células tratadas com rodamina 123 também foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest. Análises posteriores foram realizadas no software WinMDI2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, EUA). Um total de 10,000 eventos foram obtidos e as alterações na fluorescência foram quantificadas a partir do índice de variação (IV) calculado pela equação MT-MC/MC , onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento. Valores negativos de IV correspondem a despolarização da membrana mitocondrial (MENNA-BARRETO et al., 2007).

5.8 Processamento para microscopia eletrônica de varredura

Parasitas controles ou tratados com 2x a IC_{50} dos compostos mesoiônicos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e lavados 3 vezes em PBS. As células foram fixadas por 2 horas em solução contendo glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M (pH 7,2). Em sequência as amostras foram lavadas três vezes em PBS e pós-fixadas por 1 hora em solução contendo OsO_4 a 1% , ferrocianeto de potássio a 8% e CaCl_2 a 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após a pós-fixação as células foram lavadas no mesmo tampão e aderidas em lamínulas de 13 mm contendo poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por 10 minutos. Após este período as células foram lavadas em PBS para retirada das células não aderidas. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30 % a 100%) por 10 minutos e secas pelo método do ponto crítico (HCP-2 critical point dryer, Hitachi). Após este processo, as células foram metalizadas com 20 nm ouro-paládio (Fine Coat Íon Sputter JFC-1100, JEOL) e observadas ao microscópio eletrônico de JEOL.

5.9 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Para identificação de possíveis alvos intracelulares de ação dos compostos mesoiônicos, utilizamos tripomastigotas, uma vez que estas são as formas infectivas para células de mamífero. Parasitas tratados ou não com 2 x IC₅₀ dos mesoiônicos, foram lavadas e fixadas em glutaraldeído a 2,5% e paraformolaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas a temperatura ambiente, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% , ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a fixação, os parasitas foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50% -100%), infiltrados e incluídos em resina epóxi (Fluka Analytical, Polysciences). Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica Microsystem, Wetzlar, ALE) foram coletados em grades de cobre de malha 300, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 à 80 kV.

5.10 Análise estatística

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores $p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

6 RESULTADOS

6.1 Citotoxicidade

O potencial citotóxico dos compostos também foi avaliado pela técnica do MTT e mostrou que todos são capazes de induzir alguma toxicidade em macrófagos, mas o grau de toxicidade variou entre os compostos testados. O composto MECPYR-04 foi o mais tóxico com a CC_{50} de $4.4 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$. O composto menos tóxico foi o MC-02 com CC_{50} de $140.1 \pm 12.8 \mu\text{g/mL}$. Os compostos MEC-02 e MC-01 apresentaram CC_{50} de $53.17 \pm 6.7 \mu\text{g/mL}$ e $92.48 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A partir da CC_{50} foi possível determinar o índice de seletividade dos compostos (ISE). Os índices de seletividade para formas tripomastigotas foram de 3.2, 4.9, 6.5 e 12.7 para os compostos MECPYR-04, MEC-02, MC-01 E MC-02 (**Tabela 3**).

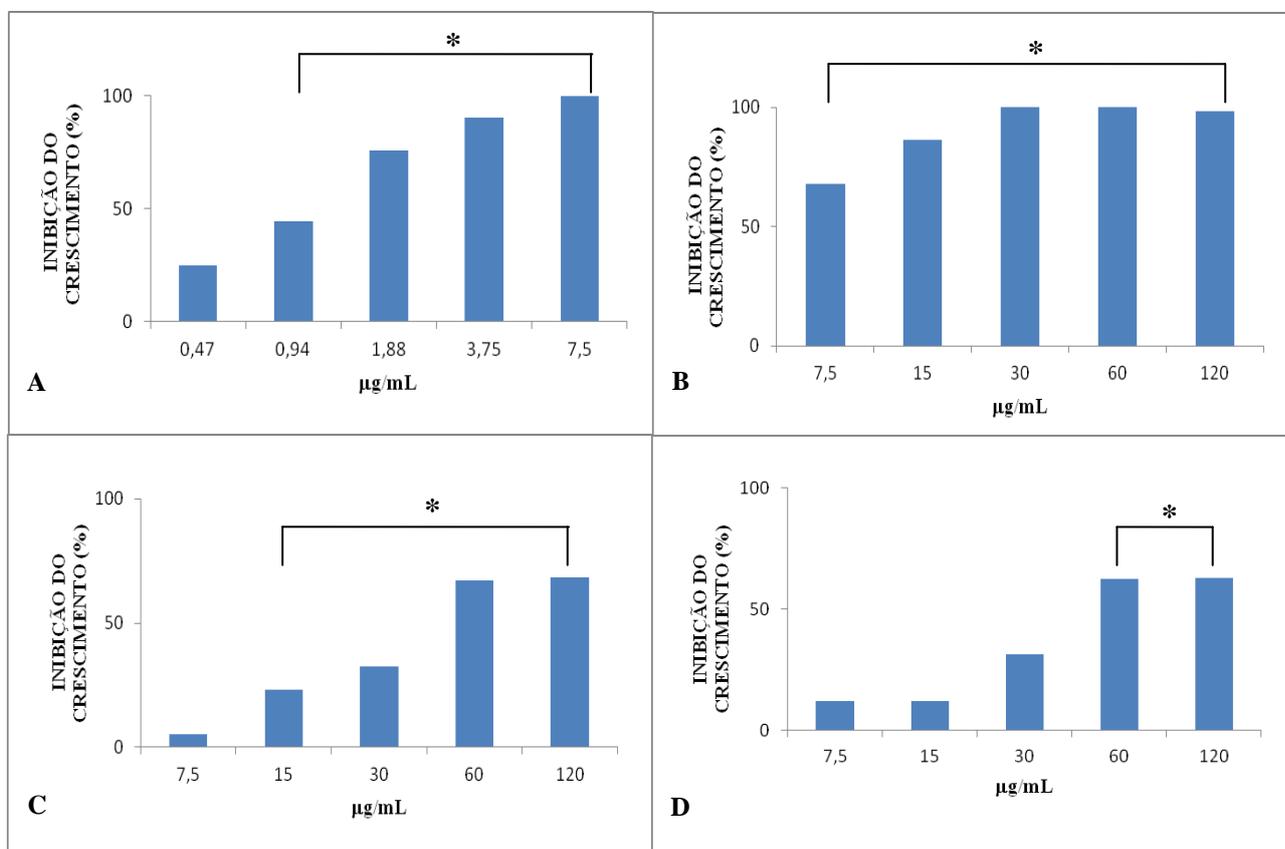
6.2 Efeito dos compostos mesoiônicos sobre o crescimento de formas epimastigotas

Com objetivo de avaliar o efeito dos compostos mesoiônicos sobre o crescimento e a viabilidade do *T. cruzi*, formas epimastigotas foram incubadas na presença ou ausência destes compostos, o crescimento das culturas foi acompanhado através de contagens diárias e a $IC_{50}/48\text{h}$ foi determinada. Nossos resultados mostram que todos os compostos testados apresentaram efeito dose-dependente sobre o crescimento do parasito evidenciado pelo caráter ascendente dos gráficos de inibição do crescimento (**Gráfico 1**). Nas concentrações variando de 0.94 a $7.5 \mu\text{g/mL}$, a inibição do crescimento foi significativa em relação ao controle para o composto MECPYR-04 e 100% de inibição foi obtida na concentração de $7.5 \mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 1A**). O tratamento com o composto MEC-02 mostrou que todas as concentrações testadas inibiram fortemente o crescimento do parasito atingindo 100% de inibição do crescimento já na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 1B**). MC-01 e MC-02 apresentaram uma atividade mais baixa e nenhuma das concentrações testadas foi capaz de atingir 100% da inibição. Em MC-02 apenas nas concentrações de 60 e $120 \mu\text{g/mL}$ houve inibição significativa do crescimento em relação ao controle (**Gráfico 1D**). Em MC-01 nenhuma diferença significativa de inibição do crescimento pode ser observada na menor concentração testada ($7.5 \mu\text{g/mL}$) (**Gráfico 1C**).

As diferenças de atividade contra formas epimastigotas também puderam ser evidenciadas através do cálculo da concentração inibitória (IC_{50}) que representa a

concentração da droga capaz de causar 50% de inibição do crescimento das culturas e está diretamente relacionada ao efeito da droga sobre o parasita. Os compostos MECPY-04 e MEC-02 foram os mais efetivos contra formas epimastigotas com valores de $IC_{50}/48h$ de $1.7 \pm 0.01 \mu g/ml$ e $7.6 \pm 1.99 \mu g/ml$, respectivamente, sendo o MECPYR-04 o mais tóxico para esta forma. O composto MC-01 apresentou valor de IC_{50} de $69.9 \pm 8.17 \mu g/ml$. O composto MC-02 foi o menos efetivo contra as formas epimastigotas, visto que apresentou o maior valor de IC_{50} , $76.8 \pm 8.19 \mu g/ml$ (**Tabela 1**).

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



Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) MECPYR-04; (B) MEC-02; (C) MC-01; (D) MC-02. Barras representam a média de 3 experimentos realizados em triplicata. *Valores estatisticamente significativos teste ANOVA ($p < 0.05$).

6.3 Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a viabilidade de formas tripomastigotas

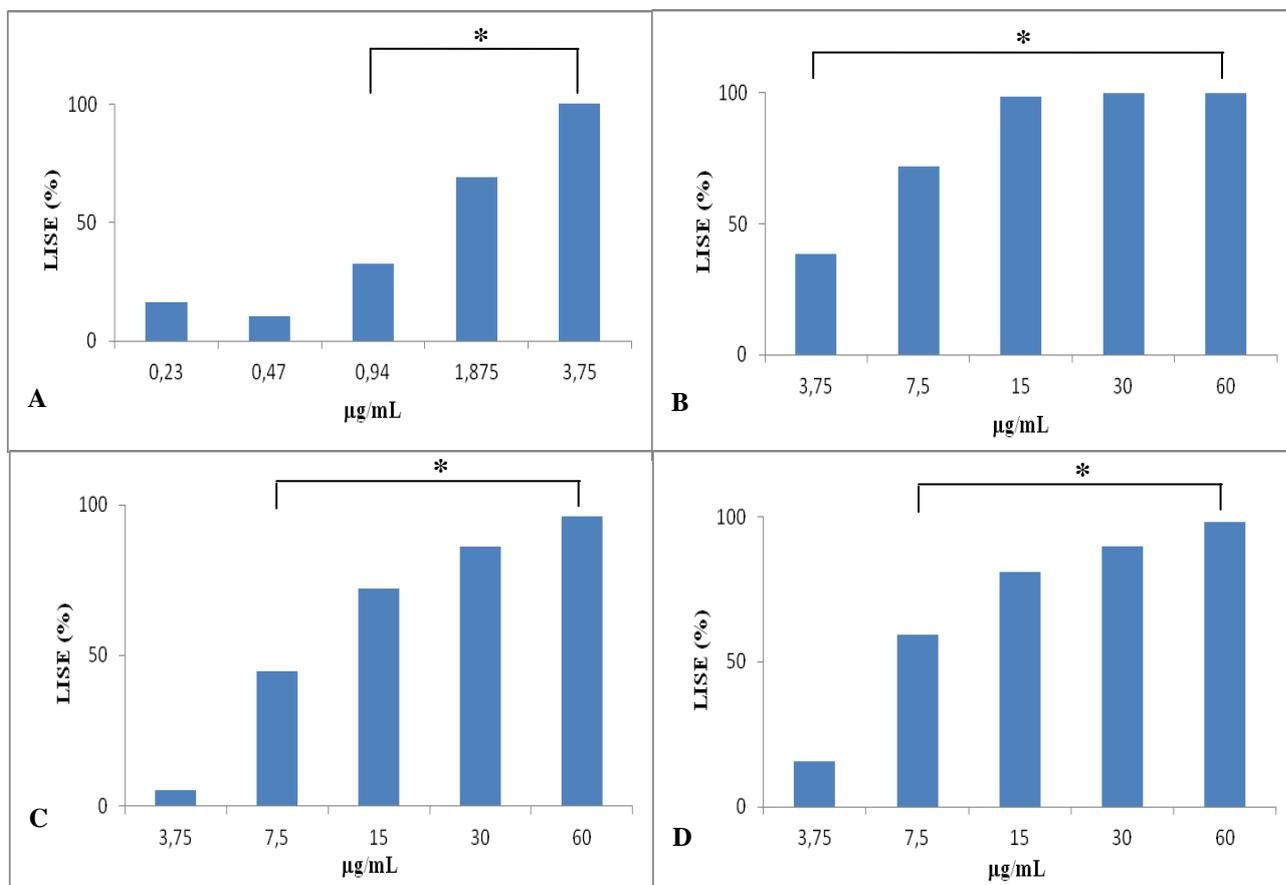
Tendo em vista que as formas tripomastigotas sanguíneas são as formas infectivas ao homem, nós avaliamos o efeito dos compostos mesoiônicos sobre a viabilidade dessas formas. Todos os compostos foram capazes de causar 100% de lise do parasito nas maiores concentrações testadas (**Gráfico 2**). O composto MECPYR-04 teve efeito significativo sobre a lise das formas tripomastigotas nas concentrações superiores a 0.94 $\mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 2A**). O composto MEC-02 teve efeito inibitório significativo em todas as concentrações testadas, induzindo em 100% a perda da viabilidade das células tratadas já na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 2B**). Ambos os compostos MC-01 e MC-02 apresentaram efeitos significativos sobre o parasito nas concentrações de 7.5 - 60 $\mu\text{g/mL}$, sendo que apenas a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de induzir 100% de lise da célula do parasito (**Gráfico 2 C e D**). Com exceção do composto MEC-02, todos os compostos apresentaram uma atividade superior contra formas tripomastigotas do que epimastigotas com valores de CL_{50} de aproximadamente 1.38, 10.9, 15.4 e 11.1 $\mu\text{g/mL}$ para os compostos MECPY-04, MEC-02, MC-01 e MC-02, respectivamente. Novamente MECPY-04 mostrou ser o mais efetivo entre os compostos testados. As maiores diferenças na atividade dos compostos foram encontradas para MC-01 e MC-02 os quais apresentaram um efeito sobre formas tripomastigotas 4.5 e 7.2 vezes maior do que a encontrada para formas epimastigotas (**Tabela 1**).

Tabela 1- Atividade *in vitro* dos compostos mesoiônicos contra as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade (ISe).

Compostos	IC_{50} epi ($\mu\text{g/mL}$)	CL_{50} tripo ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ISe (tripo)
MECPYR-04	1.7 \pm 0.01	1.38 \pm 0.38	4.4 \pm 1.1	3.2
MEC-02	7.6 \pm 1.99	10.9 \pm 1.2	53.17 \pm 6.7	4.9
MC-01	69.9 \pm 8.17	15.4 \pm 1	92.48 \pm 4.5	6.5
MC-02	76.8 \pm 8.19	11 \pm 1.3	140.1 \pm 12.8	12.7

Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: IC_{50} - concentração que inibe em 50% o crescimento de formas epimastigotas; CL_{50} - concentração que causa de 50% de formas tripomastigotas; CC_{50} – concentração que reduz em 50% a viabilidade de células de mamíferos; ISe- índice de seletividade.

Gráfico 2 - Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) MECPYR-04; (B) MEC-02; (C) MC-01; (D) MC-02. Cada barra representa a média de três experimentos em triplicata * Significância estatística pelo teste ANOVA ($p < 0.05$).

6.4 Efeitos sobre sobrevivência de formas amastigotas intracelulares

As formas amastigotas também são de grande importância para a Doença de Chagas uma vez que constituem a forma intracelular do parasito encontrado nas células de humanos. Todos os compostos foram eficientes em inibir a infecção de macrófagos por formas amastigotas. MECPYR-04 apresentou o maior efeito inibitório com valor de IC_{50} de 1.08 $\mu\text{g/mL}$ seguido por MEC-02, MC-02 e MC-01 com valores de 8.15 $\mu\text{g/mL}$, 13.1 $\mu\text{g/mL}$ e 15.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Apesar de ter apresentado uma das menores atividades contra as formas amastigotas, o composto MC-02 foi o que apresentou o maior índice de seletividade contra estas formas ($ISe = 10.7$), seguido pelo MEC-02, MC-01 e por último MECYPR-04 com valores de ISe correspondentes a 6, 5.9 e 4.1 respectivamente (**Tabela 2**).

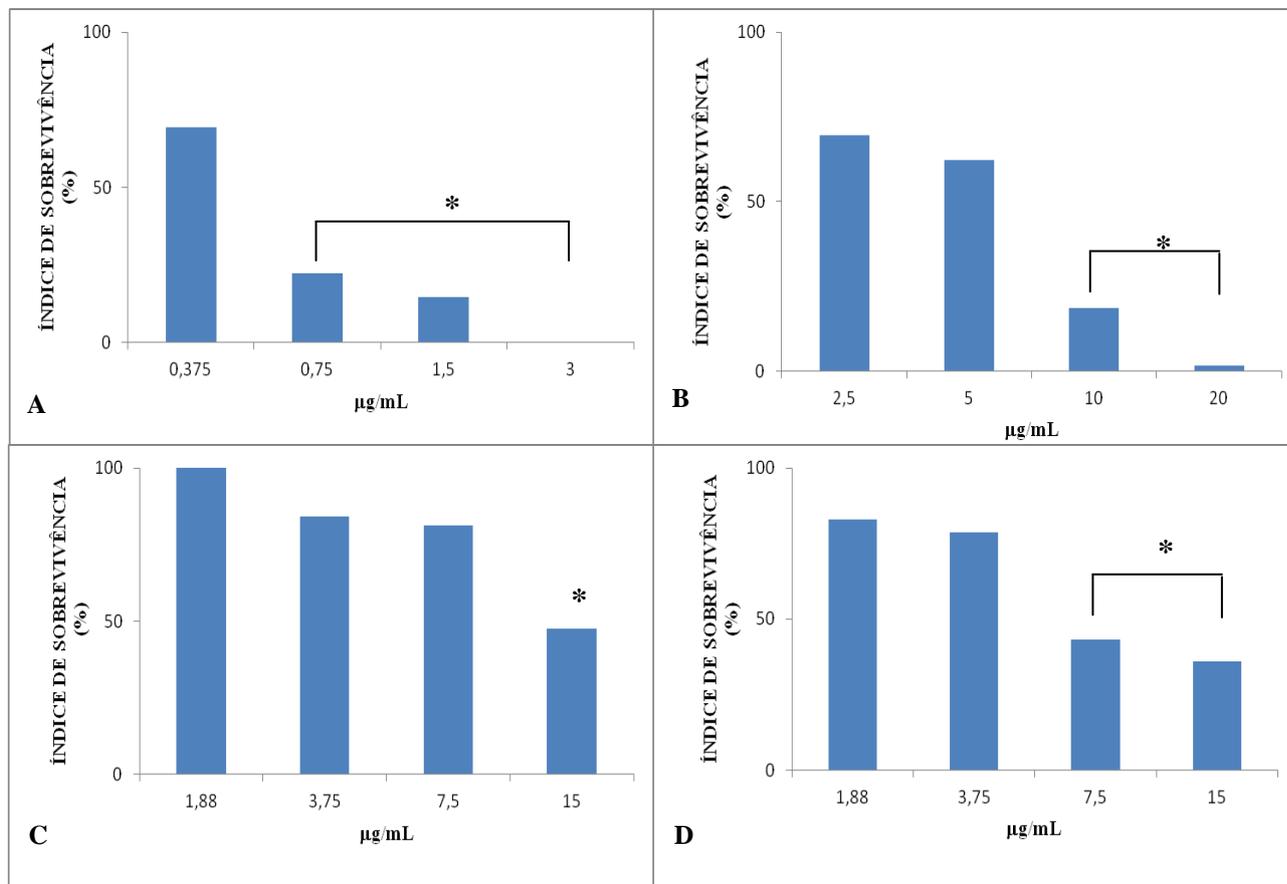
Nossos resultados mostraram que os compostos MECPYR-04, MEC-02 e MC-02 reduziram significativamente o índice de sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos nas duas maiores concentrações testadas (0.75 e 1.5 $\mu\text{g/mL}$ para MECPYR-04; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, para MEC-02 e 7.5 e 15 $\mu\text{g/mL}$ para MC-02) (**Gráficos 3A, 3B e 3D**). No entanto, MC-01 foi capaz de induzir inibição significativa apenas na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 3C**).

Tabela 2 – Atividade in vitro dos compostos mesoionicos sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Compostos	IC _{50Ama} $\mu\text{g/mL}$	ISe
MECPYR-04	1.08 \pm 0.52	4.1
MEC-02	8.15 \pm 2.76	6
MC-01	15.8 \pm 0.9	5.9
MC- 02	13.1 \pm 1.4	10.7

Fonte: Elaborado pela autora (2012).

Legenda: IC₅₀- Concentração capaz de inibir em 50% a infecção de macrófagos por formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*; IS – Índice de seletividade para formas amastigotas (CC₅₀/IC_{50ama}).

Gráfico 3- Efeito dos compostos mesoiônicos sobre o índice de sobrevivência de amastigotas

Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) MECPYR-04; (B) MEC-02; (C) MC-01; (D) MC-02. Cada barra corresponde a média de dois experimentos em duplicata. * Significância de cada média em relação ao controle. Análises estatísticas feitas pelo teste ANOVA ($p < 0.05$).

6.5 Produção de NO

Para avaliar se o efeito dos diferentes compostos sobre as formas amastigotas poderia ser resultante da ação destas moléculas sobre os macrófagos, nós avaliamos o efeito dos compostos mesoiônicos sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos. Nossos resultados mostraram que apenas MECPYR-04 e MEC-02 foram capazes de induzir um aumento significativo na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais nas maiores concentrações testadas (MECPYR-04, 7.5 µg/mL e MEC-02, 30 e 60 µg/mL). Para os outros compostos não foram observadas alterações significativas na produção de NO quando comparado com os controles (**Tabela 3**).

Tabela 3- Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a produção de Nitrito em macrófagos

(µg/mL)	Nitrito (µM)			
	MEC-02	MC-01	MC-02	MECPYR-04
0	7,5 ± 0,5	4,3 ± 0,8	4,1 ± 1,2	3,4 ± 0,3
0,47	nd	nd	nd	3,9 ± 0,7
0,94	nd	nd	nd	4,5 ± 1,2
1,88	nd	nd	nd	5,0 ± 2,3
3,75	6,6 ± 1,0	4,4 ± 0,8	4,3 ± 0,9	8,2 ± 4,8
7,5	7,6 ± 1,3	4,2 ± 0,9	4,3 ± 0,9	11,4 ± 8,0 *
15	10,8 ± 1,7	4,2 ± 0,8	4,2 ± 0,8	nd
30	17,4 ± 3,3 *	4,3 ± 1,0	4,2 ± 0,9	nd
60	32,4 ± 6,0 *	4,3 ± 1,0	4,3 ± 1,0	nd

Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: nd - Não determinado

* Significância de cada concentração em relação ao controle. Análises estatísticas feitas pelo teste ANOVA considerando significativo $p < 0.05$.

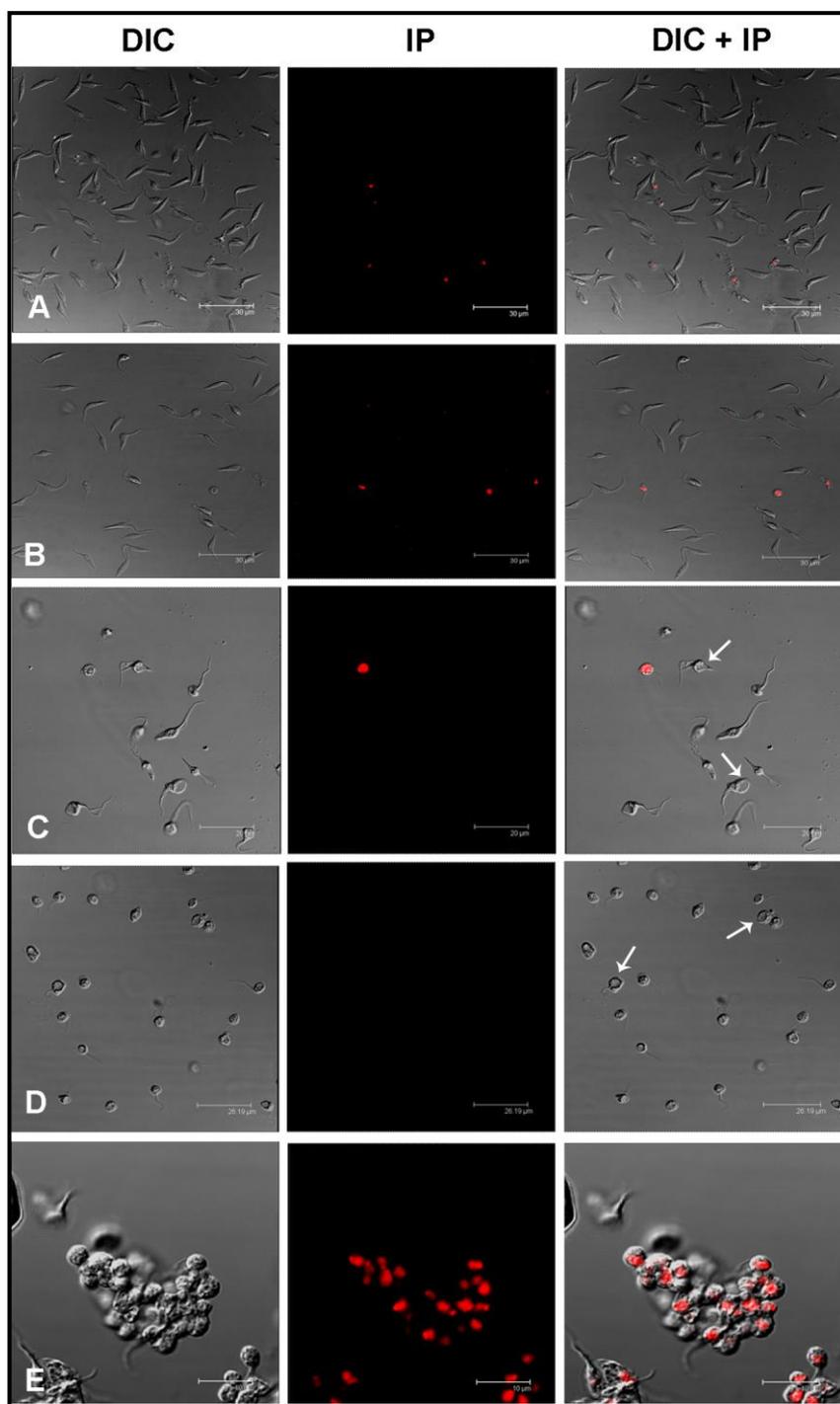
Tendo em vista que os compostos MEC-02, MC-01 e MC-02 foram os que apresentaram alta seletividade contra formas tripomastigotas e amastigotas com baixa toxicidade contra células de mamíferos, em relação ao composto MECPYR-04, estes três compostos foram selecionados para as análises subsequentes através de microscopia confocal, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

6.6 Efeito dos compostos mesoiônicos sobre a integridade da membrana e potencial de membrana mitocondrial.

Com o objetivo de avaliar os efeitos causados pelos compostos mesoiônicos sobre a integridade da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), células tratadas e controles foram submetidas à marcação com o iodeto de propídio (IP) e rodamina 123 (Rh 123) respectivamente. O iodeto de propídio é um marcador que se liga ao DNA da célula apenas quando a permeabilidade da membrana plasmática está alterada enquanto a rodamina 123 é um corante catiônico que permeia as membranas celulares sendo usado para marcar mitocôndrias em células vivas.

Como esperado células não tratadas apresentaram morfologia alongada e a marcação com o iodeto se limitava a uma ou duas células por campo (**Figura 10 A**). Células IP+ encontradas no controle apresentaram alteração drástica da sua morfologia como arredondamento e aumento do volume com diminuição da granulosidade. Pouca variação deste perfil pó de ser observado nas células tratadas com os diferentes compostos nas concentrações correspondentes a $2 \times IC_{50}$ (**Figuras 10 B-D**), mostrando que a integridade de membrana foi preservada. Por outro lado, alterações da morfologia e na motilidade dos parasitas tratados com os compostos MC-01 e MC-02, foram observadas na maioria das células através do contraste diferencial (DIC) (**Figuras 10 C e D**). A totalidade das células tratadas com etanol, usado como permeabilizante da membrana plasmática, apresentaram-se positiva para IP e alterações no volume foram detectadas nestas células (**Figura 10E**). As observações ultraestruturais através de microscopia eletrônica de varredura corroboram os nossos dados do confocal. Por esta técnica, formas epimastigotas controles não tratadas apresentam corpo alongado e membrana lisa (**Figura 11A**). Apesar de conservar as características da membrana, células tratadas com $2x IC_{50}$ de MEC 02 apresentam-se mais delgadas do que as células controles (**Figura 11B**). Diferentemente, células tratadas com MC-01 E MC-02 apresentam aumento no volume celular com arredondamento do corpo celular, embora nenhum sinal evidente de ruptura da membrana fosse identificado (**Figuras 11C e D**).

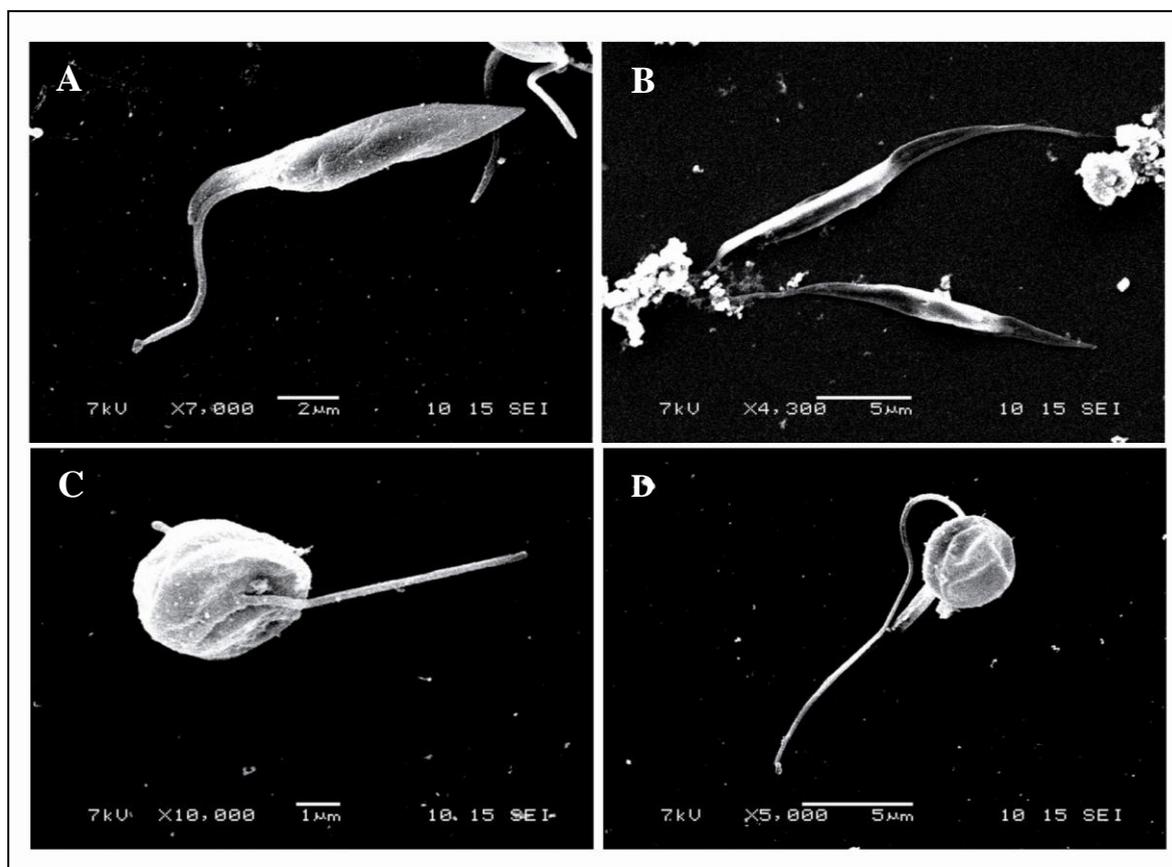
Figura 10 – Efeito dos compostos mesoionicos sobre a integridade da membrana de formas epimasitogotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legendas: (A) Células controles sem tratamento, (B) células tratadas com 2x IC₅₀ de MEC-02; (C) 2 x IC₅₀ de MC-01 e (D) 2 x IC₅₀ de MC-02 (E) controle com etanol. Note em C e D a presença de células com morfologia alterada e não marcada com IP (seta). **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial; **IP**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência do iodeto de propídio; **DIC + IP** – sobreposição das imagens de contraste interferencial (Differential Interference Contrast) com IP.

Figura 11 – Efeito dos compostos mesoionicos sobre a ultraestrutura de *Trypanosoma cruzi* como observado através da microscopia eletrônica de Varredura



Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) célula controle; (B) células tratadas com $2 \times IC_{50}$ de MEC-02, (C-D) células tratadas com $2 \times IC_{50}$ de MC-01 e MC-02. Note nestas células o aumento do volume e o arredondamento do corpo celular.

Células controles submetidas à marcação com rodamina mostraram incorporação deste corante na mitocôndria dos parasitas, evidenciada por um intenso sinal fluorescente no canal correspondente ao vermelho (543 nm) (**Figura 12A**). Pouca variação deste padrão foi identificada nas células tratadas com MEC-02, as quais se mantiveram intensamente marcadas pela rodamina (**Figura 12B**). Já nas células tratadas com MC-01 e MC-02 uma intensa diminuição no número de células marcadas e na intensidade do sinal para rodamina puderam ser observados (**Figura 12 C e D**). Tendo em vista que a rodamina 123 pode sofrer um processo de esmaecimento da fluorescência pela prolongada exposição ao laser, análises através da citometria de fluxo também foram realizadas. Nossos dados mostram que as análises de citometria estão de acordo com as análises feitas por microscopia confocal (**Figura 13**). Os compostos MC-01 e MC-02 causaram drástico efeito no potencial de membrana, como mostra os valores negativos dos índices de variação (IV) de -0.79 e -0.85,

para as células tratadas com a concentração 69.9 µg/mL e 139.8 µg/mL de MC-01 e -0.84 e -0.94 para as concentrações de 76.8 µg/mL e 153.6 µg/mL de MC-02. O composto MEC-02 não causou alterações significativas apresentando intensidade de fluorescência muito semelhante ao controle (**Tabela 6**). A figura 13 representa os histogramas representativos das análises, onde M1 corresponde as células não marcadas e M2 as células marcadas com rodamina 123.

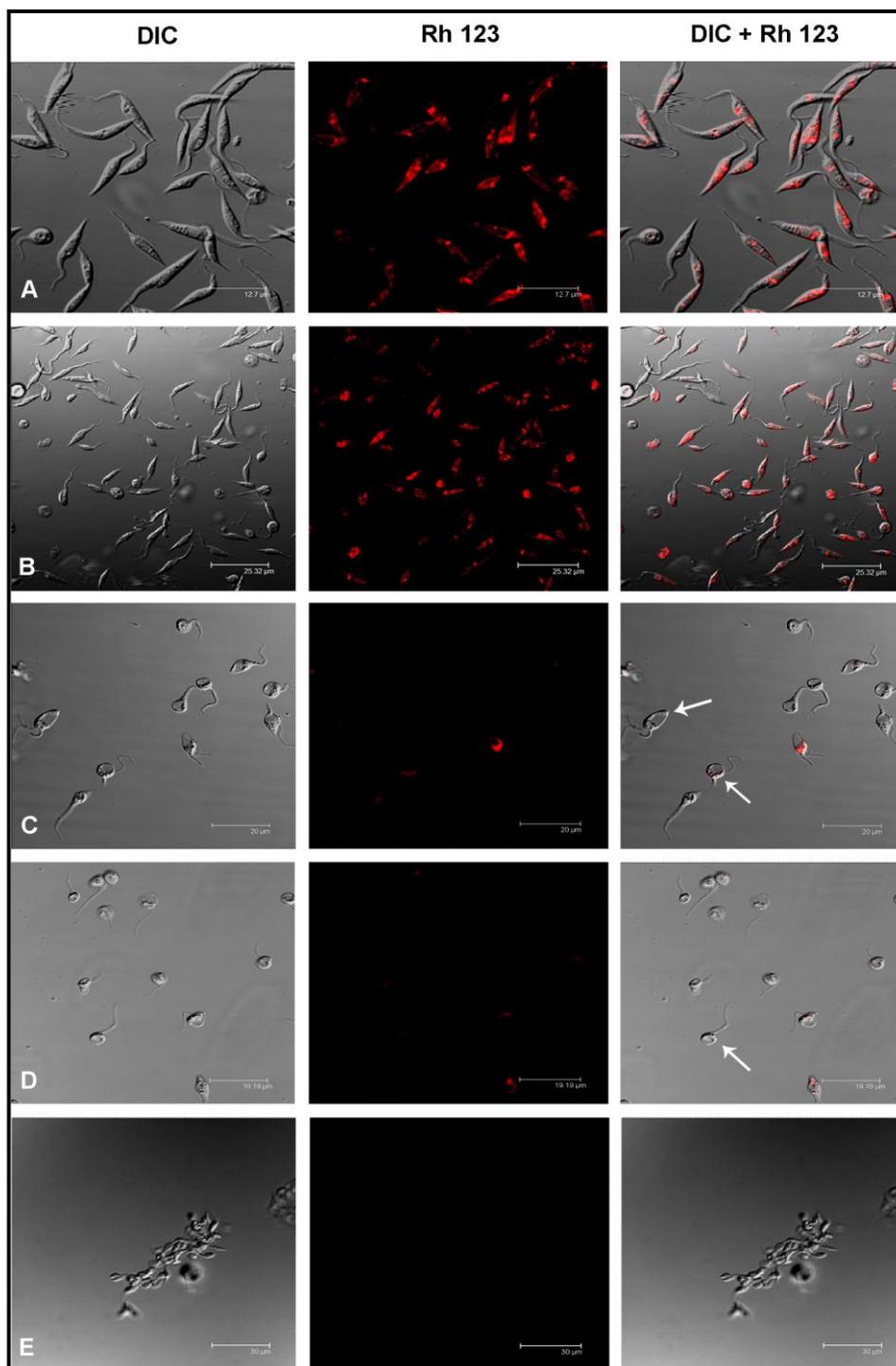
Tabela 4- Análise através da citometria de fluxo dos efeitos dos compostos mesoiônicos sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi_m$) utilizando da sonda fluorescente rodamina 123.

	Concentração (µg/mL)	M	I.V.
Controle	0	1893.84	0
MEC-02	7,6	1910.95	0,009
	15,2	1794.35	- 0,05
MC-01	69,9	381.97	- 0,79
	139,8	289.03	- 0,85
MC-02	76,8	299.61	- 0,84
	153,6	97.34	- 0,94

Fonte: Elaborado pela autora (2012)

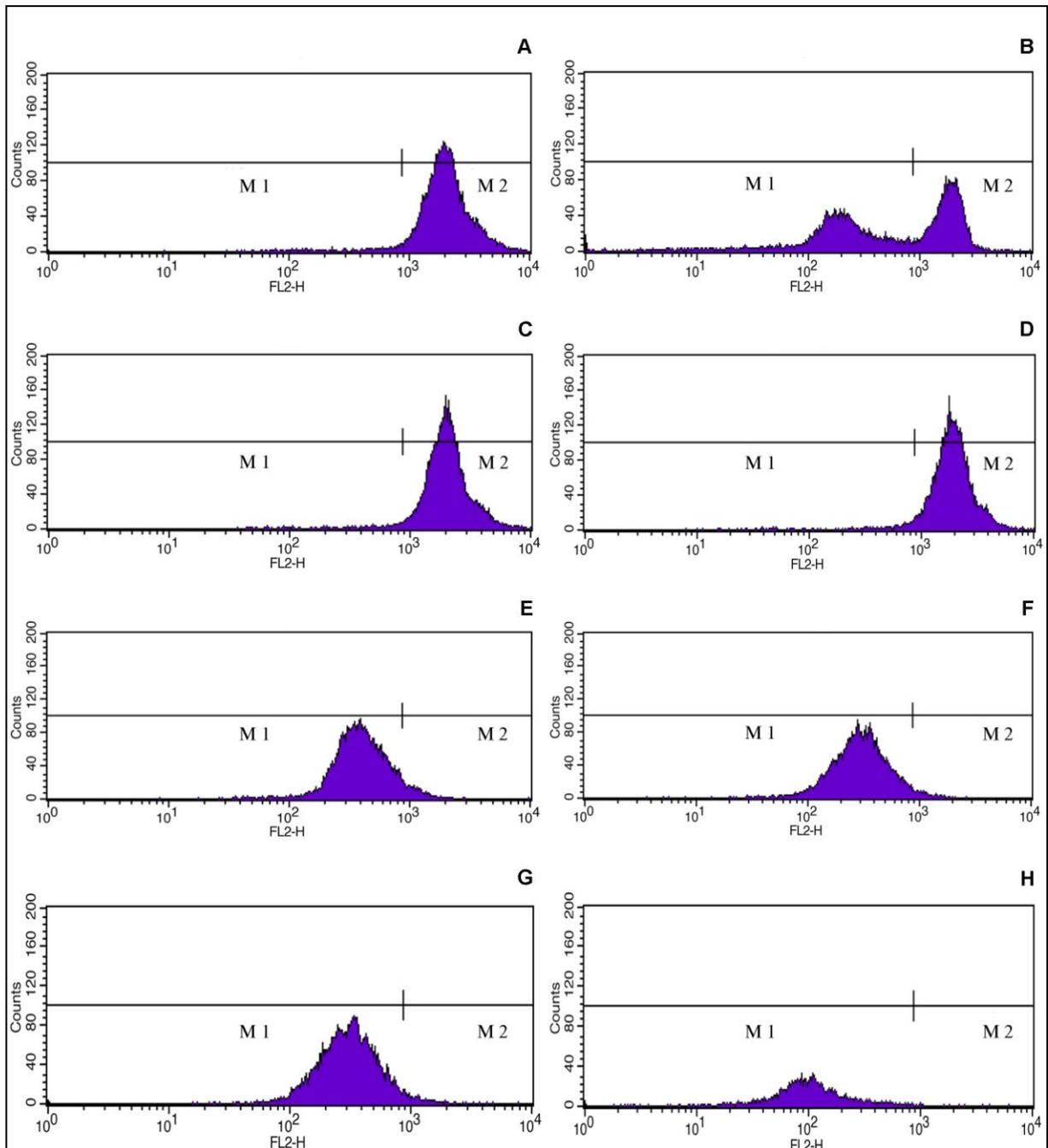
Legenda: **M-** mediana da intensidade de fluorescência; **IV-** Índice de variação calculado pela fórmula $MT - MC/MC$, onde MT é a mediana de fluorescência das células tratadas e MC é mediana da fluorescência das células controles.

Figura 12 – Efeito dos compostos mesoiônicos sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) como observado pela microscopia confocal a laser



Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) Células controles sem tratamento, (B) células tratadas com 2x IC_{50} de MEC02; (C) 2 x IC_{50} MC-01 e (D) 2 x IC_{50} MC-02 (E) controle com metanol. **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial; **Rh 123**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência da rodamina 123; **DIC + Rho** – sobreposição das imagens de contraste interferencial (Differential Interference Contrast) e rodamina 123.

Figura 13- Histograma das análises de citometria de fluxo de formas epimastigotas de *T. cruzi*

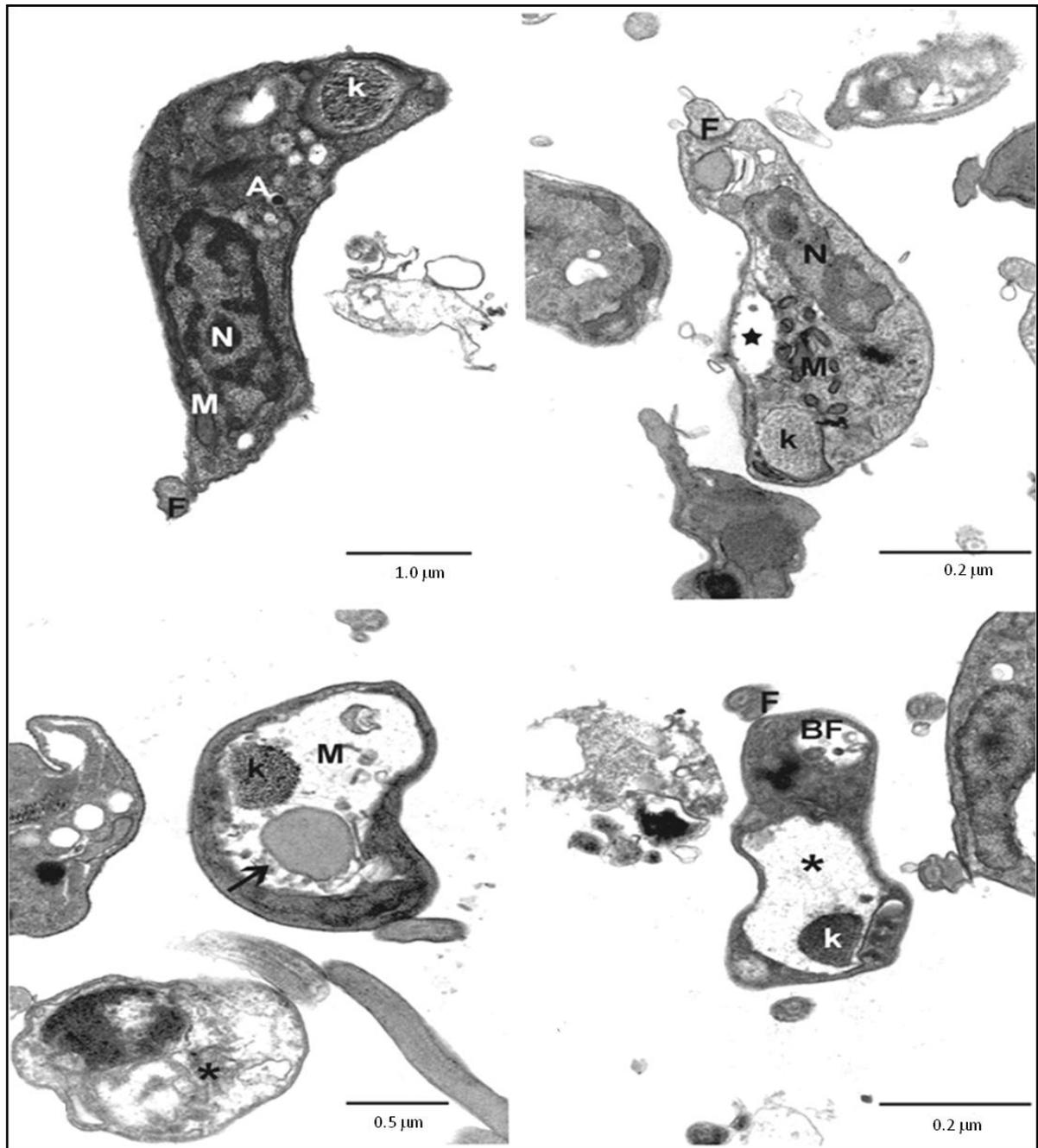
Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) Células sem tratamento ; (B) Células tratadas com metanol; (C e D) Células tratadas com a IC_{50} e $2x$ o valor da IC_{50} de MEC-02; (E e F) Células tratadas com a IC_{50} e $2x$ o valor da IC_{50} de MC-01; (G e H) Células tratadas com a IC_{50} e $2x$ o valor da IC_{50} de MC-02.

6.7 Visualização do efeito dos compostos mesoiônicos pela microscopia eletrônica de transmissão

Formas tripomastigotas controle apresentaram morfologia característica, com cinetoplasto em forma de cesta na porção posterior ao núcleo ovalado com cromatina e nucléolo evidente e citoplasma granular e homogêneo pode ser observada na figura 14A. Células tratadas com MEC-02 apresentaram pouca alteração em relação às células controles. No entanto, já é possível identificar certa desorganização intracelular e o aparecimento de espaços eletróluscentes no citoplasma destas células (**Figura 14B**). Profundas alterações na mitocôndria e no cinetoplasto puderam ser observadas nas células tratadas com MC-01 e MC-02 com aumento de volume da organela, perda do material da matriz e desorganização das cristas mitocôndrias (**Figura 14 C e D**). No entanto, a estrutura do k-DNA se manteve intacta na maioria das células. Em algumas células foi possível observar vesículas contendo material eletrondenso provavelmente formado pela coalescência das membranas das cristas mitocondriais com aprisionamento de material da matriz no seu interior (**Figura 14D**). Células com citoplasma extraído também pode ser observado nas células tratadas com MC-01 e MC-02 (**Figura 14C**).

Figura 14- Efeito dos compostos mesoionicos sobre a estrutura de formas tripomastigotas de *T. cruzi* como observado pela microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Elaborado pela autora (2012)

Legenda: (A) Forma tripomastigota controle apresentando características morfológicas preservadas. (B) Célula tratada com 2 x IC₅₀ de MEC- 02 apresentando desorganização interna e aparecimento de espaços eletrólucos (★); (C- D) Células tratadas com 2 x IC₅₀ de MC-01 e MC-02 mostrando inchaço da mitocôndria com perda da organização interna da organela e de material da matriz (asterisco). Note em (C) a presença de vesículas no interior da organela contendo material eletrondenso (seta). Células apresentando perda de material citoplasmático também podem ser observadas nas células tratadas com MC-02 (asterisco). (A) acidocalcisoma; (BF) Bolsa Fagelar; (F) Flagelo; (k) Cinetoplasto; (M) mitocôndria; (N) Núcleo.

7 DISCUSSÃO

A doença de Chagas causa altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas. Atualmente, o tratamento utilizado para esta doença é o benzonidazol, um composto heterocíclico derivado do nitroimidazol. Esta droga possui eficácia limitada, vários e severos efeitos colaterais, além de relatos de cepas resistentes ao tratamento (COURA; DE CASTRO, 2002; WILKINSON et al., 2007). A ausência de interesse por parte das indústrias farmacêuticas na pesquisa e desenvolvimento de drogas para o tratamento da doença, associado aos fatores citados anteriormente, incluem o mal de Chagas na lista das doenças tropicais negligenciadas (DE CASTRO et al., 2011). Neste sentido, por ainda não existirem compostos que atuem com mais seletividade sobre estes parasitas sem causar tantos danos ao homem, se torna cada vez mais necessário a busca por novos agentes terapêuticos.

Os compostos mesoiônicos têm despertado o interesse da química medicinal nos últimos anos devido às características estruturais incomuns e a capacidade de interagir com biomoléculas, como DNA e proteínas (DA SILVA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011). Apesar deste potencial, poucos são os estudos sobre a atividade e o mecanismo de ação destes compostos contra tripanosomatídeos parasitas (RODRIGUES et al., 2009).

No presente trabalho avaliamos o efeito de quatro compostos mesoiônicos, MECPYR-04, MEC-02, MC-01 e MC-02, sobre as formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* e sobre células de mamífero.

Inicialmente avaliamos o efeito destes compostos sobre o crescimento e a viabilidade de formas epimastigotas e tripomastigota respectivamente. A citotoxicidade para células de mamífero e o índice de seletividade sobre as formas tripomastigotas foi estimado. Nossos dados mostraram que todos os compostos foram efetivos em inibir o crescimento de epimastigotas e a viabilidade de formas tripomastigotas. O composto MECPYR-04 foi o mais efetivo contra estas formas evolutivas do parasito, porém apresentou alta citotoxicidade em macrófagos de camundongos, com $CC_{50}/48h$ de aproximadamente $4.4\mu g/mL$ e os mais baixos índices de seletividade para formas tripomastigotas (3.2) entre os compostos testados. MC-01 e MC-02 foram os menos tóxicos para formas epimastigotas como demonstrado pelas IC_{50} . No entanto estes compostos apresentaram uma toxicidade significativa contra formas tripomastigotas, indicando uma maior susceptibilidade destes últimos a droga. Diferenças de susceptibilidade a drogas entre as formas evolutivas de tripanosomatídeos encontradas nos vetores e no hospedeiro vertebrado têm sido relatadas na literatura e provavelmente são

devidas às características bioquímicas distintas existentes entre estas formas (DE CARVALHO, 2005; DE SOUZA, 1999). Consistentemente, um estudo sobre a atividade de compostos mesoiônicos derivados do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina sobre *Leishmania amazonensis* mostrou diferenças significativas na viabilidade de promastigotas quando comparada com amastigotas sugerindo que a presença de uma estrutura molecular da membrana plasmática distinta em ama- e promastigota poderia ser a responsável pelas diferenças na atividade biológica (DA SILVA et al., 2002). O composto MEC-02 apresentou uma boa atividade para ambas as formas do parasita com valores de IC₅₀ e CL₅₀ inferiores a 20 µg/mL.

Tendo em vista a relevância das formas amastigotas para a manutenção do ciclo do parasita no hospedeiro vertebrado, nós partimos para avaliar a atividade dos diferentes compostos sobre estas formas. Nossos dados demonstraram que todos os compostos foram eficazes na diminuição da carga parasitária no interior dos macrófagos e do índice de sobrevivência destas formas no interior do macrófago, com MC-01 e MC-02 apresentando os mais altos índices de seletividade de 6.0 e 10.7 respectivamente. Novamente, MCPYR-04 foi mais eficaz sobre estas formas, mas a sua toxicidade para células de mamífero teve reflexo direto sobre o índice de seletividade para amastigota que foi o menor entre os compostos testados. MEC-02 apesar de apresentar certa toxicidade para célula de mamífero foi 6 vezes mais tóxico para amastigotas. A susceptibilidade das formas amastigotas ao tratamento com os diferentes compostos pode ser atribuída às características químicas destes compostos, como sua solubilidade em lipídios que permitem que estas estruturas atravessem com facilidade a membrana plasmática da célula hospedeira e atuem sobre a forma intracelular do parasito (ATHAYDE-FILHO et al., 2000).

Para avaliarmos se o efeito dos compostos sobre as formas intracelulares de *T. cruzi* poderia ser devido a uma ação direta do composto sobre o parasita e/ou sobre macrófagos nós avaliamos o efeito dos compostos na produção de óxido nítrico por macrófagos. A produção de óxido nítrico (NO) ocorre através da oxidação da arginina catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta molécula é um dos principais mecanismos que o macrófago possui para a eliminação de patógenos intracelulares tais como *Leishmania* e *T. cruzi* (MacMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Nossos dados mostram que apenas os compostos MECPYR-04 e MEC-02 induziram de maneira significativa a produção de NO. Este aumento observado nas células tratadas com MEC-02 pode ter contribuído em parte para explicar a ação destes compostos sobre formas amastigotas. Por outro lado, uma produção exacerbada

deste radical pode também ser danosa para as células do hospedeiro (BILITEWSKI, 2008), o que poderia explicar a citotoxicidade do MCPYR-04 sobre macrófagos.

Um fator importante a se considerar é que vários compostos mesoiônicos são moléculas reconhecidas como doadoras de radicais livres como o NO (SCHÖNAFINGER, 1999). Desta forma, o aumento na produção de NO observada para MECPYR-04 e MEC-02 poderia ser resultado, não de um papel destes compostos na estimulação de macrófagos, mas da própria introdução destes radicais ao sistema. Neste caso, seria de se esperar que mesmo em baixas concentrações das drogas já houvesse alterações significativas nos níveis de nitrito nos sobrenadantes testes, fato esse não observado em nossas análises. Além do mais, a propensão de um composto heterocíclico a doar radical nitro depende tanto da estrutura química do composto quanto do fato de que cada mesoiônico requer cofatores específicos para que a liberação deste radical ocorra (SCHÖNAFINGER, 1999). Apesar dos nossos resultados apontarem para um efeito imunomodulatório de MECPYR-04 e MEC-02, futuros estudos são necessários para elucidar se o aumento da produção de NO observada pós-tratamento com os compostos mesoiônicos é devido a interação direta destes compostos com a enzima NOS2, responsável pela produção de NO em macrófago, ou/e se estes compostos atuam estimulando ou inibindo citocinas responsáveis pela regulação da produção deste radical nos macrófagos (DOS SANTOS et al., 2011).

Tendo em vista o baixo índice de seletividade e a alta toxicidade do composto MECPYR-04, apenas MEC-02, MC-01 e MC-02 foram selecionados para análises posteriores sobre os efeitos destes compostos sobre a integridade da membrana, potencial de membrana mitocondrial e a ultraestrutura de *T. cruzi*.

Inicialmente, nós testamos os efeitos das drogas sobre a integridade da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial. Os resultados obtidos a partir da análise de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas tratadas com MEC-02, MC-01 e MC-02 mostraram que estes compostos possuem pouco efeito sobre a permeabilidade da membrana plasmática. No entanto, com exceção do MEC-02 todas estas drogas foram capazes de alterar substancialmente a morfologia dos parasitas como observado tanto na microscopia confocal, quanto pela microscopia eletrônica de varredura.

A perda da integridade da membrana é uma das principais características de morte celular programada por necrose. Neste tipo de morte celular ocorrem também alterações drásticas na mitocôndria, incluindo despolarização mitocondrial, total depleção de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e perda da homeostase de Ca^{2+} e vacuolização

citoplasmática (MENNA-BARRETO et al., 2009). Nossas observações através da microscopia de varredura mostram que MEC-02 induz alterações leves na morfologia dos parasitas, aos quais se tornam mais delgados. Por outro lado, MC-01 e MC-02 causaram aumento do volume e arredondamento do corpo celular do parasita. Estes resultados são compatíveis com perda da viabilidade celular e morte celular independente de necrose, tais como a autofagia e apoptose visto que a integridade da membrana plasmática não foi significativamente afetada (MENNA-BARRETO et al., 2009; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

Um dos pontos chaves da morte celular programada por apoptose é a disfunção da mitocôndria, uma vez que alterações na permeabilidade ou no potencial de membrana desta organela estão envolvidas na sinalização e liberação de vários fatores que disparam este processo de morte celular programada (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Para verificar se alterações no potencial de membrana poderia estar ligada a morte celular do parasita, nós utilizamos a rodamina 123, marcador que se acumula especificamente na mitocôndria de células viáveis (DARZYNKIEWICZ; STAIANO-COICO; MELAMED, 1981). A marcação com rodamina 123 mostrou que apenas os compostos MC-01 e MC-02 apresentaram forte efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial, apresentando diminuição não só da intensidade da marcação quanto do número de células marcadas pela rodamina 123 em relação ao controle. Estes dados são reforçados pelos valores negativos de IV indicando intensa despolarização da membrana mitocondrial. A despolarização da membrana mitocondrial está diretamente associada, entre outros mecanismos, a alterações nos canais de Ca^{2+} e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Várias drogas que comprovadamente afetavam a mitocôndria de *T. cruzi*, estão geralmente relacionadas a interferências sobre a síntese de lipídios ou geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MENNA-BARRETO et al., 2009). No entanto, estudos com mesoiônicos em *Leishmania* falharam em mostrar uma correlação destes compostos com a inibição da síntese de ergosterol (RODRIGUES et al., 2007). As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de formas tripomastigotas mostraram que as células tratadas com o MEC-02 apresentaram poucas alterações morfológicas em relação ao controle, enquanto que as células tratadas com MC-01 e MC-02 mostraram alterações na mitocôndria do parasito, indicando que esta organela é o alvo preferencial da droga em consonância com nossos achados de citometria e microscopia confocal utilizando rodamina 123.

Devido a grande diversidade química, onde pequenas variações na estrutura básica dos compostos mesoiônicos podem causar alterações drásticas nas suas atividades biológicas, uma generalização dos prováveis mecanismos de ação destas drogas é uma tarefa extremamente difícil, ainda mais se levarmos em consideração a escassez de literatura sobre a atividade biológica destes compostos em tripanosomatídeos. No entanto, por definição todos os compostos mesoiônicos, são moléculas pequenas dipolares (contendo tanto cargas negativas quanto positivas delocalizadas através dos átomos endo- e exocíclicos) e lipofílicas o que garante livre acesso destas moléculas aos sistemas de membrana tanto do parasita quanto da célula hospedeira. Além do mais, anéis mesoiônicos estão presentes em inúmeras compostos com atividade antibacteriana e antiparasitária (OLIVEIRA et al., 2011). Estudos sobre atividade de MEC-02 e seus derivados já foram realizados em *Trypanosoma cruzi* revelando que estes compostos foram eficientes sobre todas as formas do parasita, atuando na faixa de μM (DA SILVA et al., 2008). Estes mesmos autores sugerem que a associação de anéis mesoiônicos e metilenodioxifenil é uma importante característica estrutural para atividade biológica destes compostos, mas o mecanismo de ação destes ainda é desconhecido. As poucas alterações na polarização da membrana e na ultraestrutura encontradas em parasitas tratados com MEC-02 sugerem um efeito muito mais citostático do que citotóxico para este composto.

Estudo com derivados do MEC-02 mostrou que estas estruturas foram capazes de se ligar a tripanotiona redutase através de docagem molecular (RODRIGUES et al., 2012), sugerindo que este composto possa ser um potencial inibidor para esta enzima. Ambos compostos MECPYR-04, um mesoiônico do sistema triazólico, e MEC-02, pertencente ao sistema tiadiazólico-aminida, são derivados do ácido piperínico obtido a partir da piperina, uma amida natural encontrada em várias espécies de plantas do gênero *Piper*, as quais são reconhecidas na literatura como possuidoras de inúmeras propriedades farmacológicas (DA SILVA et al., 2008; FREIRE –DE-LIMA et al., 2008). Apesar de compartilharem a mesma estrutura básica MEC-02 e MECPYR-04 diferem quanto as suas cadeias laterais e isso pode estar diretamente ligada a atividade tripanocida distintas encontradas entre estes compostos.

Estudos com mesoiônicos derivados 1,2,3-triazol do ácido siálico baseados em neoglicoconjugados associados a unidades de galactosil apresentaram efeito inibitório sobre a enzima *trans*-sialidase de formas tripomastigotas da cepa Tulahuen. Esta enzima apresenta um papel importante durante o processo de infecção em células de mamíferos. Além disso, foi observado que estes derivados também apresentaram alta toxicidade em células esplênicas

(CAMPO et al., 2012). Outros compostos heterocíclicos derivados do sistema triazol, como o posaconazol e o TAK-187, se mostraram promissores contra *Trypanosoma cruzi* e já se encontram na fase I em testes clínicos. Estes compostos apresentaram forte atividade tripanocida, porém baixa citotoxicidade em células de mamíferos (URBINA, 2010).

Compostos do sistema 1,3,4- tiadizólio-tiolato e 1,3,4- tiadizólio-aminida, do qual derivam os compostos MC-01 e MC-02, atuam como bloqueadores do canal de Ca^{2+} em bactérias Gram positivas e negativas (OLIVEIRA et al., 2011). Tem sido relatado na literatura que bloqueadores de canais Ca^{2+} alteram a permeabilidade de membrana plasmática da mitocondrial e interferem no potencial de membrana disparando o processo de morte celular (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Este mecanismo poderia explicar o efeito dos compostos MC-01 e MC-02 sobre a mitocôndria do *T.cruzi*. No entanto vale ressaltar que estes compostos apresentam um anel nitrofurano semelhante ao Nifurtimox em sua estrutura química que poderia também estar envolvido no mecanismo de ação por estresse oxidativo desta droga em *T. cruzi* (WILKINSON; KELLY, 2009).

Nossos resultados mostraram que os compostos MEC-02, MC-01 e MC-02 possuem atividade tripanocida e que causam morte celular por apoptose uma vez que foi observado arredondamento do corpo celular, conservação da permeabilidade da membrana plasmática e alterações no potencial de membrana mitocondrial. Apesar de estudos futuros ainda sejam necessários para elucidar melhor os efeitos dos compostos mesoiônicos sobre *T. cruzi in vitro* e *in vivo*, nossos resultados apontam os compostos MEC-02, MC-01 e MC-02 como agentes promissores contra a doença de Chagas.

8 CONCLUSÕES

- a) Todos os compostos mesoiônicos testados apresentaram atividade tripanocida, com MEC-02, MC-01 e MC-02 sendo os mais promissores por apresentarem altos índices de seletividade em relação as formas mais relevantes do parasito;
- b) A susceptibilidade de formas amastigotas ao tratamento pode ser devido às características lipofílicas destes compostos, permitindo a livre entrada destes no interior da célula hospedeira;
- c) O aumento na produção de NO observado em macrófagos tratados com MECPYR-04 e MEC-02 sugerem uma ação imunomodulatória destes compostos;
- d) Nossos dados mostraram que a permeabilidade da membrana não foi substancialmente afetada pelo tratamento com os compostos MEC-02 e MC-01, MC-02;
- e) As alterações observadas no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de formas epimastigotas e na ultraestrutura da mitocôndria em formas tripomastigotas apontam esta organela como principal alvo de ação de MC-01 e MC-02;
- f) A ausência de efeitos significativos no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e na ultraestrutura dos parasitas tratados com MEC-02 sugerem que este composto seja mais citostático do que citotóxico;
- g) Nossos resultados sugerem que os compostos MC-01 e MC-02 causam perda da viabilidade celular e morte celular através de apoptose;
- h) Apesar de estudos futuros ainda sejam necessários para melhor elucidação do mecanismo de ação dos compostos mesoiônicos, nossos dados sugerem fortemente os compostos MEC-02, MC-01 e MC-02 como agentes potenciais contra a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN DE NOYA, B. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.201, n.9, p. 1308-1315, mai. 2010.

ALBUQUERQUE, M. C. et al. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. **Pharmazie**, Eschborn, v. 60, n. 1, p. 13-17, jan. 2005.

ALMEIDA, I. C. et al. *Trypanosoma cruzi* mucins: potential functions of a complex structure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 173-176, fev. 1999.

ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.116, n.1, p. 44-52, mai. 2007.

ANDERZHANOVA, E. et al. Effects of sydnocarb and D-amphetamine on the extracellular levels of amino acids in the rat caudate-putamen. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdã, v. 428, n. 1, p. 87-95, set. 2001.

ANDES, D. et al. In vivo pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine Candidiasis model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1193-1199, abr. 2003.

APT, W. et al. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Abingdon, v. 99, p. 733-741, dez. 2005.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug design, Development and Therapy**, Auckland, v. 24, n. 4, p. 243-253, set. 2010.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Synthesis and Spasmolytic Activity of Mesoionic 1,4-Diphenyl-5-(5-Nitro-2-Furanyl)-1,3,4-Triazolium-2-Thiolate Hydrochloride. **Heterocyclic Communications**, Londres, v. 2, p. 573-580, dez. 1996.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Mesoionic Compounds: Amphiphilic Heterocyclic Betaines. Synthesis. **Journal of Synthetic Organic Chemistry**, Berlim, v. 2000, n. 11, p. 1565-1568, jun. 2000.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Synthesis Characterization and Evaluation of The Activity of Ten Mesoionic Compounds Against Microorganisms. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 18, n. 1, p. 17-22, nov. 1999.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. **Estudos psicofarmacológicos de 3-fenil-5-(4-etilfenil)-imidazolidina-2,4-diona**. Trabalho apresentado no 39 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, São Paulo, out. 2007.

BAKER, W.; OLLIS, W.D. Mesoionic Compounds. **Quarterly Reviews –Chemical Society**, Londres, v. 11, p. 15-29, abr. 1957.

BADAMI, B. Mesoionic compounds: An unconventional class of aromatic heterocycles. **Resonance**, Bangalore, v. 11, n. 10, p. 40-48, out. 2006.

BENAIM, G. et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 3, p. 892-899, fev. 2006.

BILITEWSKI, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1545-1554, jul. 2008.

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

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many? **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v.8, n.6, p. 510-518, set. 2008.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease, drug development: 2009-2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**. Hagerstown, v. 23, n. 6, p. 609-16, dez. 2010

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 15, n. 158, p. 5890-5901, jun. 1997a.

CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 15, n. 159, p.6131-6139, dez. 1997b.

CAMPO, V. L. et al. Design, synthesis and the effect of 1,2,3 triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 145-56, jan. 2012.

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

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

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 2, n. 11, p. 1261-1271, nov. 2002.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Life cycle. Atlanta, 2008. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> >. Acesso em: 28 jan. 2010

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

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, Basingstoke, v. 465, n. 7301, p. 4-5, jun. 2010.

CORRALES, M. et al. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1556-1560, abr. 2005.

CORTES, S. et al. Effect of structural modification of the hydantoin ring on anticonvulsant activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 28, n. 5, p. 601-606, mai. 1985.

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

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

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

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

DARZYNKIEWICZ, Z.; STAIANO-COICO, L.; MELAMED, M.R. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 4, p. 2383-2387, abr. 1981.

DA SILVA E. F. et al. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 37, n. 12, p. 979-984, dez. 2002.

DA SILVA F. W. et al. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: chemical and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 2984-2991, mar. 2008.

DE CARVALHO E. A. et al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 155-161, 2005.

CASTRO, S. L. et al. Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A morphological, biochemical, and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology International**, New York, n. 306928, p. 1-13, jan. 2011.

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

DE SOUZA, W. et al. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 421-432, set. 2000.

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

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

DE SOUZA, W. Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. **Parasitology International**, Amsterdã, v. 56, n. 3, p. 161-170, set. 2007.

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

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, Nova Iorque, p. 1-18, jul. 2009.

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

DOCAMPO, R. et al. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 310, pt. 3, p. 1005-1012, set. 1995.

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

DOS SANTOS, R.A. et al. Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism.

Parasitology, Londres, v. 138, n. 10, p. 1224-1233, set. 2011.

DUNKLEY, C. S.; THOMAS, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 13, n.17, p. 2899-2901, set. 2003.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 695-729, out. 1992.

FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, Londres, v. 29, n. 1359, p. 1295-12302, set. 1997.

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

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

FOUTS, D. L. et al. Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 34, p. 21846-21855, ago. 1998.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitology Research**, Berlim, v. 102, n. 5, p. 1059-1067, abr. 2008.

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

GRYNBERG, N. et al. Some new aryl-sydnone: effects on murine tumours. **Anticancer Research**, Atenas, v. 12, n. 3, p. 1025-1028, mai.- jun. 1992.

HAMMARTON, T. C. et al. Cytokinesis in trypanosomatids. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 10, n. 6, p. 520-527, dez. 2007.

HARRISON, J. A. et al. Probing the acceptor substrate binding site of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase with systematically modified substrates and glycoside libraries. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 7, n. 9 (5), p. 1653-1660, mar. 2011.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medical chemistry of the mesoionic compounds. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, v. 56, n. 2, p. 149-168, fev. 1967.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, Washington, v. 87, n. 1, p. 99-163, jan. 2007.

LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Disease**, Londres, v. 10, n. 8, p. 556 – 570, ago. 2010.

LESLIE, M. et al. Infectious diseases. Drug developers finally take aim at a neglected disease. **Science**, New York, v. 333, n. 6045, p. 933-935, ago. 2011.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, Amsterdã, v. 27, n. 6, p. 837 – 843, dez. 2010.

LIRA, B. F. et al. Synthesis and Characterization of some New Mesoionic 1,3- Thiazolium-5-thiolates via Cyclodehydration and *in situ* 1,3- Dipolar Cycloaddition/ Cycloversion. **Molecules**, Basel, v. 7, p. 791-800, nov. 2002.

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

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

MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and Chemotherapy. **Biological Research**, Santiago, v. 43, n. 3, p. 323-321, nov. 2010.

MCCONVILLE, M. J. et al. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 122-154, mar. 2002.

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

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. Estimated global population infected by *Trypanosoma cruzi*. New York, 2009. Disponível em: <http://www.treatchagas.org/imagens/MapChagasJun09_large.jpg>. Acesso em: 26 jun. 2011.

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

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

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p.17-30, jul. 2009.

MONTALVETTI, A. et al. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 36, p. 33930-33937, set. 2001.

MONTALVETTI, A. et al. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 37, p. 38673-38682, set. 2004.

MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Med**, São Francisco, v. 6, n. 2, p. 137-146, fev. 2009.

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

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, New York, v.16, n. 65 (1-2), 55-63, dez. 1983.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, n. 15, v. 4, p. 653-655, abr. 2009.

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

OLIVEIRA, M. F. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 37, n 3, p. 209-228, set. 2008.

OLIVEIRA C. S. et al. Drug resistance modulation in *Staphylococcus aureus*, a new biological activity for mesoionichydrochloride compounds. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 3, p. 2023-2031, fev. 2011.

OPPERDOES, F. R.; BORST, P.; SPITS, H. Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 21-28, jun. 1977.

OPPERDOES, F.R. et al. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 98, n. 4, p. 1178-1184, abr. 1984.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 127-151, out. 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas**, Buenos Aires, abr. 2007.

PAULINO, M. et al. The chemotherapy of chagas' disease: an overview. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 5, n. 5, p. 499-519, mai. 2005.

PEREIRA, M. C. The parasitology images gallery. Arthropoda: Insecta and Acari. São Paulo. Disponível em: < <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/triatoma.htm> >. Acesso em: 9 fev. 2012a.

PEREIRA, M. C. The parasitology images gallery. Arthropoda: Insecta and Acari. São Paulo. Disponível em: < <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Panstrongylus.htm> >. Acesso em: 9 fev. 2012b.

PINHO, B. R. et al. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? **PloS One**, São Francisco, v. 6, n.8, p. 24098, ago. 2011.

PRATA, A.; DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Os primórdios da doença. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 2, p.6-11, mai. 2011.

PENG, G.W. et al. Potential central nervous system antitumor agents. Hydantoin derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 18, n. 8, ago. 1975.

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

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

RASSI, A. et al. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, n. 1, p. 58-61, jan. 2007.

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

ROCHA, G. M. et al. Attachment of flagellum to the cell body is important to the kinetics of transferrin uptake by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology International**, Amsterdã, v. 59, n. 4, p. 629-633, dez. 2010.

RODRIGUES, R. F. et al. A comparative study of mesoionic compounds in *Leishmania sp.* and toxicity evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 42, n. 7, p. 1039-1043, jul. 2007.

RODRIGUES, R. F. et al. Antileishmanial activity of 1, 3, 4 – thiadiazolium-2-aminide in mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 2, p. 839-842, fev. 2009.

RODRIGUES, R. F. et al. The in vivo activity of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide compounds in the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 67, n. 1, p. 182-190, jan. 2012.

ROHLOFF, P. et al. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 50, p. 52270-5281, dez. 2004.

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

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogenactivated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 710-718, mai. 2009.

RUIZ, F. A. et al. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in Response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 28, p. 26114-26121, jul. 2001.

SABORIO, J. L. et al. Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*, **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 5, n. 264, p. 4071-4075, mar. 1989.

SALOMON, C. J. First century of chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, v. 101, n. 3, p. 888-894, dez. 2011.

SALTO, M. L. et al. Phospholipid and glycolipid composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdã, v. 158, n. 2, p. 120-130, abr. 2008.

SERRANO-MARTÍN, X. et al. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1403-1410, abr. 2009.

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

SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **International Journal for Parasitology**, Oxford, n. 31, v. 13, p. 1403-1415, nov. 2001.

SCHÖNAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **Farmaco**, Pavia, v. 54, n. 5, p. 316-320, mai. 1999.

SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 31, p. 24215- 24221, ago. 2000.

SENFF-RIBEIRO, A. et al. Cytotoxic effect of a new 1,3,4- thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British Journal of Cancer**, Londres, v. 91, n. 2, p. 297-304, jul. 2004.

SOARES, M. J. et al. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 34, n. 2, p. 199-203, mai. 1987.

SOARES, M. J. et al. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, Londres, n. 102, pt. 1, p. 157-167, mai.1992.

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

URBINA, J. A. et al. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 42, n. 7, p. 1771-1777, jul. 1998.

URBINA, J. A. et al. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdã, v. 21, n. 1, p. 27-38, jan. 2003a.

URBINA, J. A. et al. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdã, v. 21, n. 1, p. 39-48, jan. 2003b.

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

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

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

VIDA, J. A. et al. Anticonvulsants. 5. Derivates of 5-ethyl-5-phenylhydantoin and 5,5-diphenylhydantoin. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 18, n.4, p. 383-385, 1975.

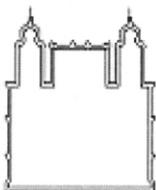
VERCESI, A. E. et al. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. **The Biochemical Journal**, Londres, n. 304, pt. 1, p. 227-233, nov. 1994.

WERBEL, L. M. et al. Antischistosomal effects of 5-(2, 4, 5-trichlorophenyl) hydantoin and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 20, n. 12, p. 1569-1572, dez. 1977.

WILKINSON, S.R. et al. A mechanism for cross resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, abr. 2008.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, n. 11, p. 1-24, out. 2009.

Anexo A- Parecer do CEUA/CPqAM



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

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

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

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

- 2 *Oryctolagus cuniculus*

- 400 *Mus musculus*

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

Rio de Janeiro, 24/09/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ