

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESCOBERTA DE NOVOS QUIMIOTERÁPICOS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE
CHAGAS**

Aluno: Artur Felipe Santos Barbosa
Orientadora: Suely Lins Galdino
Co-orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

Recife, Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESCOBERTA DE NOVOS QUIMIOTERÁPICOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇA DE
CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de Mestre.

**R E C I F E
2 0 1 0**

Barbosa, Artur Felipe Santos

Descoberta de novos quimioterápicos para o tratamento de doença de Chagas/ Artur Felipe Santos Barbosa. – Recife: O Autor, 2010.

91 folhas : il., fig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos

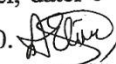
1. Chagas, Doença de 2. Doença do barbeiro 3. Doenças tropicais 4. Farmacologia - Pesquisa 5. Medicamentos – Desenvolvimento I. Título.

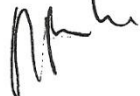
616.9363

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 100

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos dois dias do mês de março de dois mil e dez, às nove horas, no Auditório do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a Defesa de Dissertação, em regime fechado, apresentada pelo Mestrando **Artur Felipe Santos Barbosa**, intitulada: "**Descoberta de novos quimioterápicos contra a doença de chagas**". A Banca Examinadora foi homologada em doze de janeiro de dois mil e dez, pela PROPESQ, tendo como membros titulares os Professores: **Suely Lins Galdino**, Doutora em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade de Grenoble, França, **Maira Galdino da Rocha Pitta**, Doutora em Ciências, pela Universidade de Marselha, França, **Antônio Luiz Barbosa Pinheiro**, Doutor em Clínica Odontológica, pela Universidade de Birmingham; **Ivan da Rocha Pitta**, Doutor em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Grenoble, França e **Maria do Carmo Alves de Lima**, Doutora em Química Orgânica e Bioquímica, pela Universidade de Paris VI, França, suplentes. A Prof.^a Suely Galdino deu início à Sessão para mais uma Dissertação do Programa. Agradeceu pela presença de todos e passou a palavra ao Mestrando para fazer exposição de sua dissertação, que efetuou em trinta e cinco minutos. Continuando, a presidenta solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr. Antônio Luiz Pinheiro (1º examinador), Dr.^a Maira Galdino Pitta (2º examinador), Dr. Suely Galdino (3º examinador). Dando continuidade, a presidenta abordou a importância do trabalho desenvolvido pelo aluno e, em seguida, expressou seus agradecimentos aos membros da banca, dando procedimento à avaliação. A Comissão Examinadora atribuiu a **Artur Felipe Santos Barbosa** a seguinte menção: "**Aprovado**" por unanimidade. Face ao resultado o mesmo está apto a receber o grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Biologia Química para a Saúde**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e para constar, eu Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata junto com demais presentes. Recife 02 de março de 2010. 

1. H. Felipe Santos Barbosa Maira Galdino da Rocha Pitta.

RESUMO

A Doença de Chagas ou Trypanosomíase Americana é um grave problema de saúde pública que afeta cerca de 18 milhões de pessoas por todo o mundo, principalmente na América Latina. A doença pode ser contraída de diversas formas onde as principais são pela transmissão do protozoário a partir de um mosquito infectado, por via oral ou transfusão sanguínea. O movimento de migração, do interior do país para as grandes cidades ou de turistas estrangeiros, tem feito com que a doença se disseminasse por mais lugares. Assim como as outras doenças tropicais negligenciadas, o tratamento disponível para os pacientes chagásicos é escasso. Atualmente apenas dois medicamentos são comercializados, o benzonidazol e o nifurtimox, ambos com sérios problemas com suas administrações. Políticas de incentivo a novos medicamentos e/ou terapias vem sendo estimuladas pelo TDR (Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais) e o DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*). Baseado nisto, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antichagásico de novos derivados tiazolidínicos, verificando seus efeitos citotóxicos em células de camundongos isogênicos, sua atividade tripanocida contra as formas tripomastigota e epimastigota dos *Trypanosoma cruzi* e verificar através de microscopia eletrônica os sítios de interação dos compostos nas ultra-estruturas do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados encontrados demonstram que os derivados tiazolidínicos testados apresentam valores da concentração de citotoxicidade compatíveis em relação às drogas padrão. Dois derivados se destacaram nos testes de atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, LPSF-SF 29 e o LPSF-GQ 109, com valores de IC₅₀ relativamente baixos. Ao se observar as mudanças que estes dois compostos ocasionaram no interior do *T. cruzi*, verificamos modificações que possivelmente indicam que os parasitas estão em um processo de morte celular programada. Pode-se concluir então que além das atividades biológicas já descritas na literatura, os derivados tiazolidínicos podem ser novos candidatos a agentes anti-*Trypanosoma cruzi*, sendo necessários estudos com novos compostos com substituintes estruturalmente diferentes além de testes biológicos mais aprofundados.

Palavras-Chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Tiazolidinas

ABSTRACT

The Chagas disease or American Trypanosomiasis is a serious public health problem and affects about 18 million people around the world, especially in Latin America. The disease can be contracted in different ways and the main ones are the transmission of the parasite from an infected mosquito, oral or blood transfusion. The movement of migration, from the countryside to large cities or foreign tourists, causes the disease from spreading to many places. Like the other neglected tropical diseases, treatment available for patients with Chagas disease is scarce. Currently only two drugs are marketed, benznidazole and nifurtimox, both with serious problems with their administration. Policies to encourage new drugs and/or therapy has been stimulated by TDR (Special Program for Research and Training in Tropical Diseases) and the DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative). Based on this, this study was to evaluate the antichagasic potential of the new thiazolidine derivatives, checking their cytotoxic effects on cells of isogenic mice, its trypanocidal activity against the trypomastigote and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and check through electronic microscopy sites of interaction of compounds in ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*. The results show that thiazolidine derivatives tested showed values of the concentration of cytotoxicity compatible with respect to standard drugs. Two products stood out during the activity tests anti-*Trypanosoma cruzi*, LPSF SF-29 and LPSF GQ-109, with IC₅₀ values relatively low. By observing the changes that these two compounds resulted in the interior of *T. cruzi*, we observed changes that may indicate that the parasites are in a process of programmed cell death. Can therefore be concluded that in addition to biological activities described in the literature, the thiazolidine derivatives may be new candidates to anti-*Trypanosoma cruzi*, studies are needed with new compounds with different substituents structurally and addition to biological testing them further.

Key Words: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, Thiazolidines

LISTA DE FIGURAS

Imagens	Pág.
Figura 1: Imagem do Dr. Carlos Chagas - J. Pinto. Arquivo Iconográfico da Casa de Oswaldo Cruz, FOC(VPCC-F)2-1.....	13
Figura 2: A - <i>Triatoma infestans</i> ; B- <i>Triatoma megistrus</i> ; C- <i>Triatoma brasiliensis</i>	15
Figura 3: Sinal de Romaña da Doença de Chagas.....	16
Figura 4: A- formas amastigotas intracelulares do <i>Trypanosoma cruzi</i> ; B - formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> ; C - formas tripomastigotas sanguíneas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 5: Reprodução dos primeiros desenhos de <i>Trypanosoma cruzi</i> feitos por Carlos Chagas em 1909, onde pode-se ver os estágios de desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados e vertebrados.....	20
Figura 6: A - Esquema geral da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> mostrando as principais estruturas celulares (Docampo et al., 1975); B – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de uma forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> demonstrando Núcleo (N), Cinetoplasto (K) e Flagelo (F). (Barbosa, 2010).....	22
Figura 7: Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 8: Nifurtimox: 3-methyl- <i>N</i> -[(1 <i>E</i>)-(5-nitro-2-furyl)methylene]thiomorpholin-4-amine 1,1-dioxide.....	26
Figura 9: Benzonidazol: <i>N</i> -benzyl-2-(2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)acetamide.....	26
Figura 10: Subestruturas baseadas na tiazolidina A - Tiazolidina; B - Tiazolidin-2-ona; C - Tiazolidin-4-ona; D - Tiazolidin-5-ona; E - Tiazolidina-2,4-diona.....	28
Figura 11: Anel tiazolidinônico e possibilidades de substituições.....	29
Figura 12: Mecanismo de ação proposto para os fármacos nifurtimox e benzonidazol.....	30
Figura 13: Derivado tiazolidínico LPSF-SF 29 causa mudanças importantes na ultra-estrutura de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	49
Figura 14: Derivado tiazolidínico LPSF-GQ 109 causa mudanças importantes na ultra-estrutura de tripoamastigotas de <i>T. cruzi</i>	51

SUMÁRIO

Ítem	Pág.
1.INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. A Doença de Chagas.....	13
2.2. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.2.1. Aspectos Morfológicos.....	18
2.2.2. Ultra-estrutura.....	19
2.2.3. Ciclo Biológico.....	23
2.3. Tratamento.....	24
2.4. Novas Perspectivas Terapêuticas.....	26
2.5. Tiazolidinas.....	28
2.6. Mecanismo de Ação: o Papel do Grupo NO ₂	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Biological Evaluation of New Thiazolidines Derivatives against <i>Trypanosoma cruzi</i> ; International Journal of Parasitology.....	32
4.2. OUTROS RESULTADOS.....	46
5. CONCLUSÃO.....	52
6. PERSPECTIVAS.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
Anexo I: Normas da Revista.....	71
Anexo II: Comprovação da Submissão.....	78
Anexo III: Material e Métodos.....	80
Anexo IV: Resumos em Congressos.....	87

DEDICATÓRIA

*Ao meu Deus,
pois como Autor da Vida, Ele me permitiu viver, e ser quem sou,
através de sua Luz!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por verdadeiramente ser meu consolador nos momentos de dificuldades, tristezas e dúvidas, pela força, estímulo e graça que pude encontrar nEle, Obrigado Pai!

A Profa. Suely Lins Galdino, por não ter desistido de mim quando eu ainda era da Propesq, tendo aberto minha visão para a Doença de Chagas e hoje ser como uma mãe para mim, possibilitando passos importantíssimos: profissional e pessoal!

A Profa. Valéria Rêgo Alves Pereira, por ter aberto as portas de seu laboratório e me mostrado quem é o *Trypanosoma cruzi*, obrigado pela colaboração, orientação, atenção e confiança liberada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Ivan da Rocha Pitta, por ter tido a humildade de ter conversado certa vez comigo na reitoria, mostrando-me que Doenças de Chagas tem um impacto importante sobre a saúde das populações, o que só me trouxe benefícios, obrigado professor.

A Profa. Maria do Carmo Alves de Lima, por ser a Super Nena, pelos conselhos e puxões de orelhas!

Ao Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, pela receptividade, apoio, incentivo, estímulo, encorajamento, lições científicas e disposição em ajudar-me!!! Não sei como agradecer-lhe.

A Ivana, minha Esposa, por ser minha auxiliadora, companheira, inspiração, bem como meu dínamo de energia. Ainda mais agora, mãe de meu Asaph.

Aos meus Pais, Newton e Elizete, por terem me gerado e criado e hoje eu dedico também a vocês estes trabalhos, pois vocês são minhas referências!

A Pedro, por ser meu irmão e a pessoa que eu mais conto, pois sempre me ajuda.

A Fabiana Gomes, Fabitcha, por todo companheirismo, amizade, hombridade e trabalho que podemos desenvolver ao longo desses dois anos de trabalhos contínuos.

A Lucas Rocha, pela paciência em estar me ajudando dia após dia no laboratório e biotério. Obrigado por transmitir sempre alegria e sua prática inquestionável de laboratório.

A Andresa Oliveira, Maria Carolina e Marina Assis, por toda alegria e tristezas que passamos nesse período, tudo isso vai ser inesquecível.

A todos do PPGCB, pelo carinho e amizade gerada nesses anos!

A todos que colaboraram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos!!!

1.INTRODUÇÃO

Durante a construção de uma ferrovia em Minas Gerais, no início do século XX, um médico sanitarista mineiro chamado Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, foi enviado para combater a malária na região. Lá constatou um alto índice de insetos da ordem hemíptera, mais conhecido como barbeiro que viviam em habitações humanas. Ao estudar esses o barbeiro, encontrado normalmente entre fendas de paredes e telhados das casas de taipa, o Dr. Carlos Chagas descobre um protozoário, o qual foi posteriormente denominado *Trypanosoma cruzi*. Paralelamente, detectou alterações patológicas naqueles habitantes e, com firmes propósitos, passou a pesquisar a ligação entre o parasita e a população. Tais estudos renderam a essa enfermidade o nome de doença de Chagas. O Dr. Carlos Chagas também descreveu o ciclo de vida do parasita, identificou o inseto transmissor do parasita, além de identificar pequenos mamíferos que agem como reservatórios hospedeiros, sugerindo meios para ajudar a prevenir a transmissão (NEVES, 2005).

A Doença de Chagas é encontrada exclusivamente na América Latina. A distribuição geográfica da doença ocorre em 18 países localizados em duas zonas ecológicas: a primeira corresponde ao Cone Sul da América, onde os insetos vivem no interior das residências das pessoas; a segunda zona compreende a parte sul da América do Norte, América Central e México, onde o vetor vive no interior e fora das moradias (MONCAYO-SILVEIRA, 2009).

A prevenção e o controle da Doença de Chagas podem ser feitos através de várias estratégias: tratamento das residências com inseticidas, triagem sanguínea nas transfusões, tratamento com medicamentos em determinados casos, melhoria da estrutura das casas (substituindo paredes e telhados), entre outros (COURA, 2007).

No tratamento específico da Doença de Chagas, dois fármacos podem ser utilizados: o nifurtimox e o benzonidazol. Reconhece-se que houve avanços em seu conhecimento, manejo e indicações. Entretanto, tem que ser destacado que os fármacos atualmente disponíveis não são ideais na sua efetividade e segurança para o paciente, o que torna pertinente o estímulo e esforços para a obtenção de novos fármacos mais efetivos, com menor toxicidade e menos efeitos colaterais (OPS/MSF, 2005). Antígenos de *T. cruzi* podem estimular a autoimunidade (PARODI, 2009). As perspectivas para uma vacina efetiva são frágeis, mas pesquisadores da Fiocruz em colaboração com a Unifesp se uniram para desenvolver um adenovírus recombinante contendo antígenos do *T. cruzi* (FIOCRUZ-RODRIGUES, 2009).

Chama a atenção que esses dois fármacos, nifurtimox e benzonidazol, são capazes de curar cerca de 50% das infecções recentes. Esses produtos são ativos na fase aguda e por um curto período

(até alguns anos) na fase crônica. Entretanto, eles possuem pouca ou nenhuma atividade a longo prazo na forma crônica da doença. Também, ambas as substâncias possuem freqüentes e sérios efeitos colaterais, sendo assim seu uso limitado (SOEIRO, 2009).

A Argentina e o Brasil têm estabelecido protocolos para tratamento de indivíduos diagnosticados durante a fase aguda ou início da fase crônica, especialmente nas áreas onde a transmissão por vetores foi controlada. Similarmente, alguns países têm guias e programas para detecção e tratamento de doenças de Chagas congênita. Entretanto, a implementação de estratégias de tratamento é seriamente limitada devido ao fato de que esses fármacos não são disponíveis para muitos pacientes em países endêmicos, seja porque não possuem registro, seja pelos elevados preços para sua aquisição. O cuidado contínuo com pacientes portadores da doença de Chagas na forma crônica é baseado em um longo período de tratamento assintomático, o qual é caro e requer infra-estrutura clínica especializada. Não raro, esta exigência está fora do alcance financeiro dos pacientes (MONCAYO-SILVEIRA, 2009).

O Anel heterocíclico tiazolina é uma sub-estrutura comum que ocorre na química orgânica, encontrado numa variedade de produtos naturais de interesse estrutural e biológico como as mirabazóis, tingazóis e tantazóis os quais demonstram atividade citotóxica contra tumores em murinos e uma série de outras atividades biológicas como anti-virais, bactericida, fungicida e mais outras atividades.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* de novos derivados tiazolidínicos, verificando sua toxicidade frente a células animais, sua atividade tripanocida e identificar os possíveis alvos de atuação dos compostos através de microscopia eletrônica. Uma vez que a Organização Mundial de Saúde recomenda que novas pesquisas sejam direcionadas para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas. Nesta perspectiva, a avaliação de compostos tiazolidínicos, os quais são um importante grupo de moléculas heterocíclicas encontradas em produtos naturais e preparadas por via sintética para utilização na clínica médica, podem ser um forte candidato a novos fármacos tripanocidas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A Doença de Chagas

Em 1909, o Dr. Carlos Chagas (Figura 1) realizou a descrição única de uma descoberta médica, uma nova doença conhecida como Tripanossomíase Americana, bem como seu vetor e o agente causador, um protozoário hemoflagelado denominado *T. cruzi*, o qual pode ser transmitido para humanos através dos seguintes mecanismos divididos em dois grupos: (i) de insetos triatomíneos sugadores de sangue, por via oral ou contato com o sangue contaminado, e (ii) por acidentes de laboratórios, manejo de animais infectados, transplantes de órgãos, transmissão sexual, ferimentos, contato com esperma ou fluido menstrual contaminado e, hipoteticamente, inoculação criminal proposital ou contaminação de comida com o parasita (CHAGAS, 1909; MONCAYO, 2009; DIAS, 1997; COURA, 2007). Esta descoberta iniciou um movimento para caracterização das manifestações clínicas da doença e sua significância epidemiológica (LARANJA et al, 1956). O Dr. Carlos Chagas também pontuou as implicações sociais da doença, relacionando as populações primárias atingidas de baixo status socioeconômico e os resultados de altos níveis de morbidade e mortalidade (CHAGAS, 1909). Um visionário e humanista comprometido, o Dr. Carlos Chagas preveniu das implicações biossociais da gênese, evolução e continuação da doença, a qual, desta forma, requer tratamento e controle apropriados que vá mais longe que o campo da biologia (OLIVEIRA-JUNIOR, 2009).



Figura 1: Imagem do Dr. Carlos Chagas - J. Pinto. Arquivo Iconográfico da Casa de Oswaldo Cruz, FOC(VPCC-F)2-1.

Segundo a Paleoparasitologia, a doença de Chagas também foi um sério problema entre as populações pré-históricas, especialmente com as repentinas mortes de adultos jovens e as

consequências da fase crônica, que é considerada nas formas intestinal e cardíaca. A descrição de lesões típicas da doença de Chagas detectadas por PCR positiva para *T. cruzi* em múmias naturais encontradas no deserto do Atacama (onde o clima frio e seco age na preservação dos corpos), com 9000 anos, demonstra a antiguidade da doença e infecção em humanos (ROTHHAMMER et al, 1985; FORNACIARI et al, 1992; GUHL et al, 1997; GUHL et al, 1999; GUHL et al, 2000; FERREIRA et al, 2000; AUFDEHEIDE et al, 2004; ARAÚJO et al, 2009). Não há dúvidas que a doença de Chagas era presente em meio às populações pré-colombianas, que agora compõem o Chile e o Peru. Grupos humanos pré-históricos no continente Americano provavelmente tiveram contato com o parasita em várias ocasiões, dependendo do caminho que eles atuaram e interagiram com o ambiente (EMPERAIRE e ROMANÑA, 2006). Tudo isso foi demonstrado com o passar dos anos começando por Rothhammer e colaboradores (1985) descrevendo lesões cardíacas consistentes com a fase crônica da doença. Em 1992, Fornaciari e colaboradores identificaram formas amastigotas em múmias Incas. Em 1997 e 1999, Guhl e colaboradores, utilizando técnicas moleculares, isolaram o DNA de *T. cruzi* presentes no tecido da múmia. Finalmente, em 2004, Aufderheide e colaboradores isolaram o DNA de *T. cruzi* de múmias de Chinchorro datadas de 9000 anos.

A doença de Chagas é uma zoonose transmitida em focus na natureza ou em unidades ecológicas sem uma boa definição de ambiente geográfico. As unidades ecológicas são compostas por mamíferos domésticos ou silvestres e por insetos silvestres do gênero *Triatoma* (Figura 2), ambos infectados com *T. cruzi*. Mais que 130 espécies foram encontradas como potenciais vetores do *T. cruzi*, e no Brasil 52 espécies destes triatomíneos foram descritas, mas cinco tem uma importância epidemiológica particular porque foram domesticadas: *Triatoma infestans* (principal do Cone Sul), *Panstrongylus megistrus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*. Transmissões contínuas são asseguradas com ou sem o envolvimento de humanos. Essas condições de transmissão estão presentes da latitude 42° Norte a latitude 40° Sul, significando que infecções com *T. cruzi* ocorrem do Sul dos Estados Unidos ao Sul da Argentina. A figura mostra a distribuição da infecção de Chagas nas Américas, enfatizando as zonas endêmicas e antropozoonóticas do Brasil (MONCAYO -SILVEIRA, 2009; COURA e DIAS, 2009).

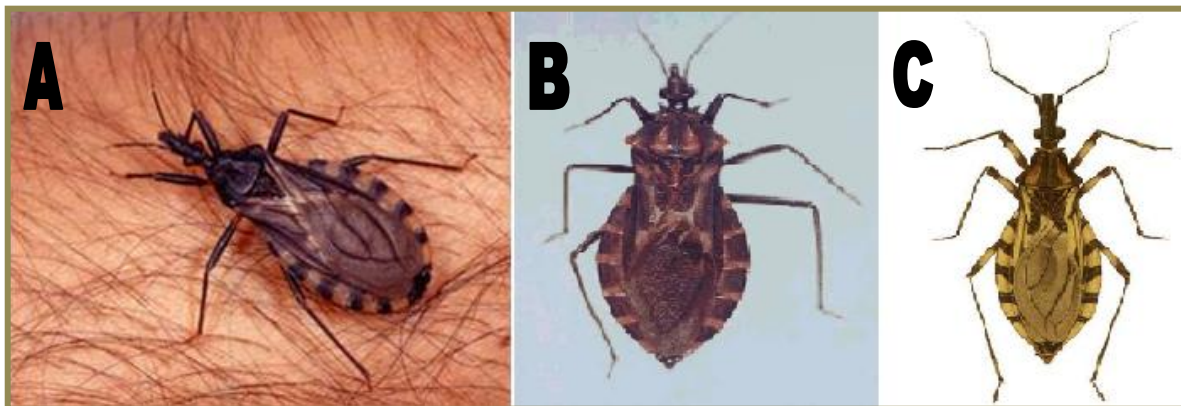


Figura 2: A - *Triatoma infestans*; B - *Triatoma megistrus*; C - *Triatoma brasiliensis* (Coleção Entomológica - Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

O movimento de migração da zona rural para a zona urbana que ocorreu na América Latina, entre as décadas de 1970 e 1980, modificou o modelo epidemiológico tradicional da doença de Chagas como uma condição da zona rural e transformaram para dentro da zona urbana numa infecção que pode ser transmitida via transfusão sanguínea. Em muitos países da América Latina agora é obrigatório a verificação dos sangues doados a bancos de sangue e sistemas para a constatação da infecção (MONCAYO e SILVEIRA, 2009). Várias centenas de milhares de pessoas infectadas com o *T. cruzi* podem estar vivendo infectadas na América do Norte, Europa e outros países como resultado da imigração para estas áreas numa busca por melhores condições de vida (SCHMUNIS, 2007).

A doença de Chagas possui duas fases clínicas sucessivas: a aguda e a crônica. A fase aguda permanece por cerca de seis a oito semanas (MONCAYO e SILVEIRA, 2009). Nesta fase da infecção, parasitas são facilmente encontrados replicando-se em diferentes órgãos e tecidos bem como no sangue circulante. Durante essa fase de infecção, a resposta imune adaptativa anti-*T. cruzi* reduz e controla o parasitismo, mas não causa uma completa erradicação (WHO, 2002). Em muitos casos não há sintomas, mas nos casos sintomáticos existem pontos que sinalizam a inoculação: o chagoma ou Sinal de Romaña (Figura 3), com febre, uma inflamação generalizada nas glândulas, edema, hepatoesplenomegalia, miocardites e meningoencefalite (COURA et al, 2007).



Figura 3: Sinal de Romaña da Doença de Chagas (WHO)

Uma vez que a fase aguda diminui, sucederá a fase crônica, onde mais pacientes infectados recuperam-se aparentemente de seu estado de saúde, no qual nenhum dano a órgão pode ser detectado utilizando os métodos de diagnósticos clínicos padrões atuais. A infecção somente pode ser verificada por testes parasitológicos e sorológicos. Esta forma da fase crônica da doença é chamada de forma indeterminada. De qualquer forma, vários anos depois da entrada na fase crônica, 20 a 35% dos indivíduos infectados, dependendo da área geográfica, poderá desenvolver lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo, no coração, esôfago, cólon ou sistema nervoso periférico. A fase crônica permanece por toda a vida do indivíduo infectado (MONCAYO e SILVEIRA, 2009). Há também a então chamada forma congênita mencionada mais cedo, onde a transmissão ocorre através da placenta ou cordão umbilical durante o parto, e isto poderá ocasionar aborto, fetos prematuros ou com lesões orgânicas. Por último, existe também a forma em imunossuprimidos, na qual a infecção crônica pode voltar a ser aguda novamente, produzindo através disto miocardites difusas, lesões no sistema nervoso central e graves meningoencefalites (COURA, 2007)

Concordando que os espaços epidemiológicos e entomológicos não foram ultrapassados com as divisões políticas, os Ministérios da Saúde da Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai lançaram a “Iniciativa para a Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas” em Brasília, em Junho de 1991. (MERCOSUR, 1991) Desde que o vetor do *T. cruzi* nestes países, *T. infestans*, é intradomiciliar, mantém-se a implementação de medidas de controle, que tenham de forma sucedida, interrompido a transmissão da doença de Chagas. Representantes técnicos de cada Ministério foram designados para constituir uma Comissão Intergovernamental carregada da implementação e avaliação dos programas de controle. A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) foi apontada com a Secretaria desta Comissão tem como principal função a promoção e coordenação. Os objetivos da

Iniciativa do Cone Sul foram claramente estabelecidos desde o início e engloba a interrupção da transmissão vetorial e transfusional. Depois, outros objetivos desta Iniciativa foi a introdução, do mesmo modo como o tratamento etiológico e cuidados médicos de pacientes infectados como um dever ético. Dados atuais da desinfestação de casas, verificação de bancos de sangue e incidência de infecção com idades inferiores há cinco anos indicam que as transmissões congênicas e transmissões transfusionais da Doença de Chagas foram interrompidas no Uruguai (1997), no Chile (1999) e no Brasil (2006). A doença de Chagas foi focalizada para eliminação pela Assembléia Mundial de Saúde na Resolução WHA 51.14, aprovada em maio de 1998, a qual foi recentemente revista pelo Corpo Executivo da Organização Mundial de Saúde, em janeiro de 2009 (PAHO, 2007; WHO, 1994; WHO, 1995; WHO, 1996; WHO, 1997; WHO, 1998a; WHO, 1998b; WHO, 1999; WHO, 2000a; WHO, 2000b; WHO/TDR, 2006; WHO, 2009).

O Modelo implementado no Cone Sul foi Adaptado a Iniciativa dos Países Andinos em 1996 e a América Central em 1997(WHO, 2009), e mais recentemente na Iniciativa Amazônica, em 2004 (MONCAYO e SILVEIRA, 2009). De um ponto de vista geral, as mais importantes mudanças alcançadas pela Iniciativa do Cone Sul foram: (i) interrupção da transmissão de *T. cruzi* pelo *T. infestans*, certificado no Brasil, Chile, Uruguai e Região Leste do Paraguai e de cinco das províncias endêmicas da Argentina; (ii) notável redução na transmissão vetorial na Bolívia graças as casas desinfetadas com inseticidas nas áreas endêmicas e controle regular de vetores ativos no Sul do Peru, onde infestações domiciliares também são causadas pelo *T. infestans*; (iii) redução de transmissão por espécies secundárias no Brasil; e (iv) verificar todos os bancos de sangue em todos os países (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

Cem anos após sua descoberta, a doença de Chagas ainda é epidemiologicamente relevante, afetando mais de 17 milhões de pessoas em 18 países endêmicos na América Latina e possuindo mais de 100 milhões de pessoas em áreas de risco e a ocorrência de cerca de 50000 novos casos a cada ano (COURA, 2007; DIAS, 2007; MONCAYO e SILVEIRA, 2009; SCHMUNIS, 2007). Continua sendo um dos mais importantes problemas de saúde pública e econômicos na maioria dos países da América Latina, onde todos os anos aproximadamente 21.000 pessoas morrem em decorrência as complicações oriundas da doença de Chagas (SATHLER-AVELAR, 2009; ROCHA et al, 2009; SCHMUNIS, 2007). Recentemente, o Ministério da Saúde Brasileiro divulgou dados confirmando a ocorrência de 2.476 casos (1.603 vetoriais, 16 transfusionais, 7 transplacentário e 850 casos onde a forma de transmissão

não foi identificada) da doença na sua forma aguda entre os anos de 2001 a 2006, com 95 mortes (<http://dtr2004.saude.gov.br>).

Considerando o interesse nas ações para conter a disseminação da doença de Chagas, ficam alguns desafios: (i) preocupação com um grande número de indivíduos com a doença de Chagas crônica que precisam ser tratados e ficam sob observação; (ii) manutenção dos programas de controle dos vetores; (iii) encorajamento e suporte ao surgimento de novas drogas que sejam mais efetivas e menos tóxicas para o tratamento etiológico dos casos crônicos; e (iv) encorajamento e instrução para pesquisas e outras ações estratégicas, como as discutidas por Coura (COURA, 2007).

2.2. *O Trypanosoma cruzi*

2.2.1. Aspectos Morfológicos

Através da microscopia óptica é possível se identificar morfolologicamente algumas características no *T. cruzi*, como posição do cinetoplasto, a posição entre o flagelo e o núcleo, a localização da bolsa flagelar e a localização do flagelo livre, levando a classificação dos parasitos sob três formas evolutivas: os amastigotas, os epimastigotas e os tripomastigotas (Figura 4) (SIQUEIRA-BATISTA, 2007; FIOCRUZ-TÉCIA, 2009).

- **Amastigotas:** Encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, possui forma arredondada com o cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região que precede o núcleo. Possui um flagelo curto, mas que não é visível ao microscópio óptico, tendo como único movimento a rotação, figura 4A.
- **Epimastigotas:** É a forma evolutiva encontrada no interior do tubo digestivo do triatomíneo. Possui forma alongada com cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar com abertura lateral e percorre aderido a parte do corpo do parasito, figura 4B.
- **Tripomastigota:** Corresponde à forma altamente infectante extracelular localizada em ambos os hospedeiros; no invertebrado é o tripomastigota metacíclico e no vertebrado – tripomastigota sanguíneo. Possui forma alongada (podendo ser largo ou fino) e cinetoplasto arredondado na região posterior ao núcleo, figura 4C.

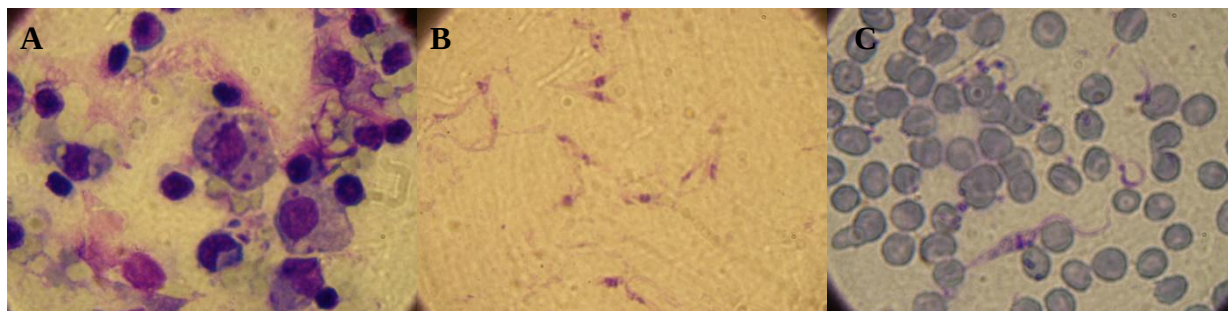


Figura 4: A- formas amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*; B - formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*; C - formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* (PediatriaTropical, 2009)

2.2.2. Ultra-estrutura

O *T. cruzi* é o agente etiológico da Tripanossomíase Americana, ou Moléstia de Chagas – é um protozoário flagelado, pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, classe *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma*. Desde as suas descrições iniciais, Chagas observou a morfologia nos vários estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (Figura 5) (SIQUEIRA-BATISTA et al., 1998; SIQUEIRA-BATISTA, 2007; DE SOUZA, 2009).

Como protozoário, o *T. cruzi* possui a estrutura de células eucarióticas com membrana celular, citoplasma e núcleo.

Membrana Celular: À semelhança das demais membranas biológicas, a membrana celular do *T. cruzi* é composta por dupla camada lipídica, na qual estão imersas inúmeras proteínas. Seus principais componentes são: Fosfolipídios, Proteínas e Glicocálice. A superfície celular da forma epimastigota é em geral mais lisa em comparação com as formas amastigotas e tripomastigotas, que apresentam sua superfície mais rugosa, diferenças apresentadas possivelmente causadas pela dimensão das mucinas localizadas na membrana. Encontramos também uma região na membrana celular das formas epimastigotas e amastigotas uma estrutura denominada citóstomo, que está envolvido na captação de macromoléculas do meio (REY, 2001; SIQUEIRA-BATISTA et al., 1996; FIOCRUZ, 2009).

Citoplasma: O *T. cruzi* apresenta organelas características das células eucarióticas, como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ribossomos, possuindo também o cinetoplasto – típico

da ordem *Kinetoplastida* e encontrado em todas as formas evolutivas, o blefaroblasto e um flagelo (ADADE et al., 2007; BRENER, 1997; DE SOUZA, 2002).

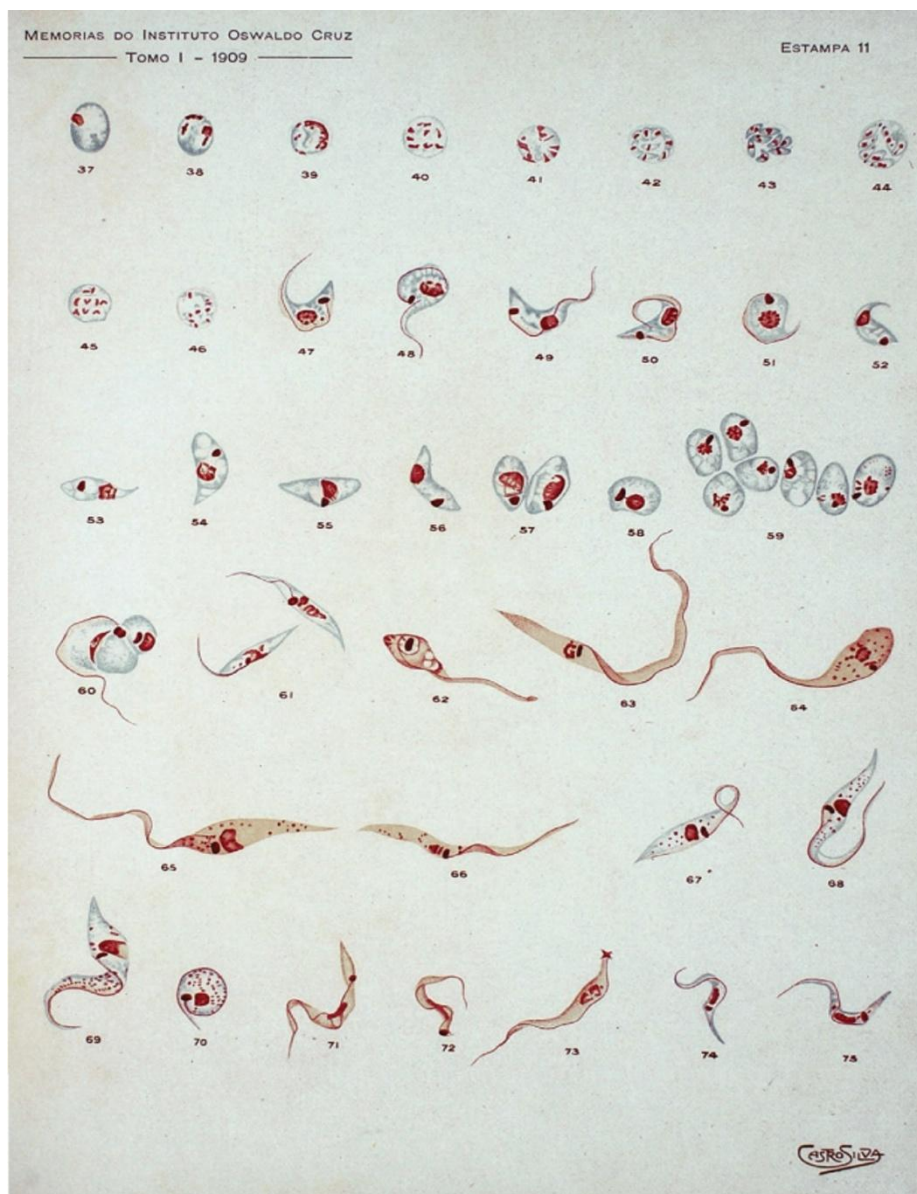


Figura 5: Reprodução dos primeiros desenhos de *Trypanosoma cruzi* feitos por Carlos Chagas em 1909, onde pode-se ver os estágios de desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados e vertebrados (Chagas, 1909).

- **Mitocôndria** – É única, tubular, possuindo paredes irregulares e cristas, com aspectos dependentes do estágio parasitário analisado, tendo como elemento limitante uma dupla membrana mitocondrial; ademais, apresenta íntima relação com o cinetoplasto, havendo

continuidade estrutural entre a parede de ambas as organelas (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

- **Cinetoplasto** – Estrutura peculiar da ordem *Kinetoplastida* e contém elevada concentração de DNA extracelular do parasito, conhecido como DNA cinetoplástico ou k-DNA (DIAS e MACEDO, 2005). O k-DNA possui cerca de 5 a 20 mil minicírculos e 50 cópias de maxicírculos por rede, diferindo do DNA nuclear por sua composição de bases, estrutura molecular e ausência de ligações com histonas. A principal função dos minicírculos é na codificação da informação genética necessária para edição do RNA, já a dos maxicírculos é codificar enzimas da cadeia respiratória – como ATPase e citocromoxidase (WESLEY e SIMPSON, 1973; KLEISEN et al., 1976, SHAPIRO e ENGLUND, 1995; LUKES et al., 2002; SIQUEIRA-BATISTA, 2007, DE SOUZA, 2009).

Flagelo: É observado em todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*. Mesmo na forma amastigota, um pequeno flagelo é observado. O flagelo apresenta um tipo de estrutura de nove pares de microtúbulos periféricos duplos e um par central. O flagelo encontra-se intimamente ligada a um corpúsculo basal o qual por sua vez encontra-se firmemente associado a membrana mitocondrial externa onde ocorre condensação do DNA e que é conhecida como **cinetoplasto** (DE SOUZA, 2009; FIOCRUZ, 2009).

Rotas de Secreção: As rotas secretórias de *T. cruzi* são formadas por retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, localizado sempre entre o núcleo e o cinetoplasto, e um sistema de vesículas que brotam das cisternas de Golgi e migram em direção a bolsa flagelar onde eles se fundem e o conteúdo é despejado dentro desta bolsa (DE SOUZA, 2009).

Rotas Endocíticas – Endocitose: Em muitas células eucarióticas, mesmo nos protozoários patogênicos, a endocitose é o mecanismo básico pelo qual macromoléculas são internalizadas. Moléculas endocitadas são subsequenteemente degradadas no sistema endossomal-lisossomal, gerando precursores importantes para várias rotas metabólicas. Estudos com *T. cruzi* demonstram certas peculiaridades do protozoário em relação a endocitose: (i) a ingestão de macromoléculas pó meio da via endocítica é basicamente feita pela forma epimastigota, e tal atividade é inexistente ou muito baixa

nas formas amastigota e tripomastigota; (ii) os epimastigotas tem dois sítios de ingestão das macromoléculas – bolsa flagelar e citóstoma; (iii) todas as macromoléculas ingeridas pela células são concentradas no **reservossomo** (DE SOUZA et al., 2009; FIOCRUZ, 2009).

Núcleo: O núcleo é envolvido por uma membrana porosa típica, contém cromatina condensada dispersa por toda parte no nucleoplasma. Pode ter aspectos diversos como denso ou frouxo, alongado ou elipsóide ou esférico, dependendo da forma evolutiva que se encontra o protozoário (DE SOUZA & MEYER, 1974; SOLARI, 1995; ELIAS et al., 2001; REY, 2001).

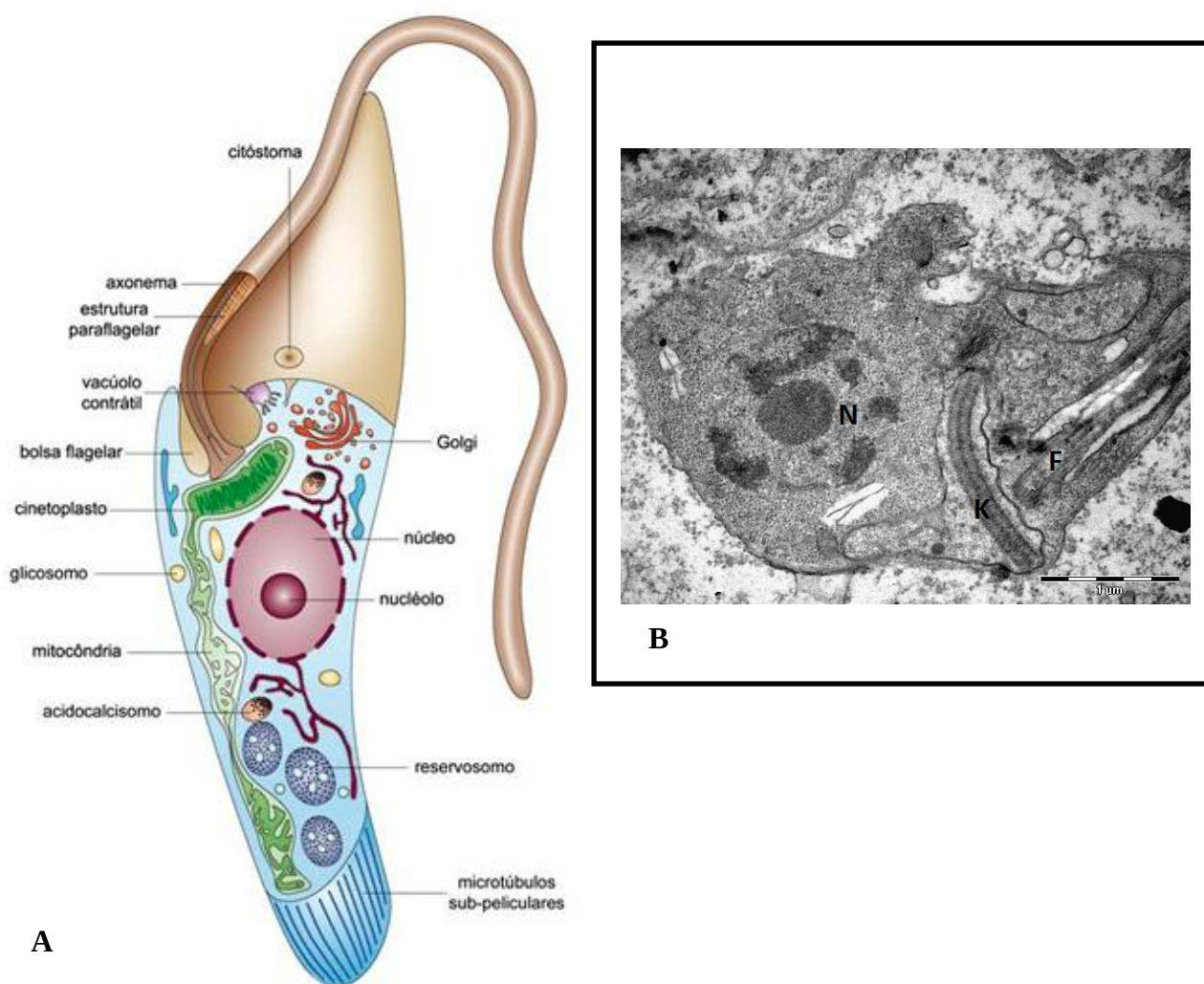


Figura 6: **A** - Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (Docampo et al., 1975); **B** – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de uma forma epimastigota de *T. cruzi* demonstrando Núcleo (N), Cinetoplasto (K) e Flagelo (F). (Barbosa, 2010).

2.2.3. Ciclo Biológico

O *T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária, epimastigotas e amastigotas, e a forma não replicativa e infectantes - tripomastigotas. O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é complexo (Figura 7), marcado por uma série de transformações ao longo de seu processo vital (BRENER, 1997; SIQUEIRA-BATISTA ET AL, 1996; WHO, 2002; FIOCRUZ-AZAMBUJA, 2009).

Ao realizar o hematofagismo, o inseto infectado alimenta-se do sangue do hospedeiro invertebrado o que o força a eliminar sua massa de excreta depositada em seu sistema digestivo, sendo geralmente depositada na superfície da pele, item 1 da figura 7. Nestas fezes encontra-se a forma infectante tripomastigota metacíclico. Devido à movimentação dos parasitos e a presença de enzimas histolíticas, o indivíduo picado causa escoriações ou feridas na pele facilitando a entrada dos protozoários para a circulação e para outras regiões do corpo como a mucosa ocular, gerando o conhecido **Sinal de Romaña**. Os tripomastigotas metacíclos são extremamente infectantes, podendo invadir os primeiros tipos celulares que encontram – fibroblastos, macrófagos ou células epiteliais, que geralmente os fagocitam. No interior destes elementos do Sistema Mononuclear fagocitário (SMF), ocorre à proliferação e liberação de formas tripomastigotas e estas formas por sua vez podem atingir a corrente circulatória e atingir todos os tecidos do hospedeiro, onde sofrerem por grandes transformações estruturais tornando-se amastigotas multiplicativos, item 2 figura 7. Tais formas sofrerão uma série de divisões binárias sucessivas no interior das células infectadas. Aproximadamente 12 horas antes da ruptura da célula, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneas, os quais após a lise das células, poderão invadir novas células, viabilizando a permanência no hospedeiro, item 3 e 4 da figura 7 (SIQUEIRA-BATISTA, 2007; FIOCRUZ-DE SOUZA, 2009). Caso o hospedeiro seja picado novamente por outro triatomíneo, item 5 da figura 6, este poderá ingerir tripomastigotas sanguíneos, e no intestino estas formas transformam-se em epimastigotas e mutiplicam-se, item 6 e 7 da figura 7. Já na porção posterior do intestino, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos em um processo chamado metaciclogênese, item 8 da figura 7 (FIOCRUZ-AZAMBUJA, 2009).

Doença de Chagas: Ciclo de Vida do *Trypanossoma cruzi*

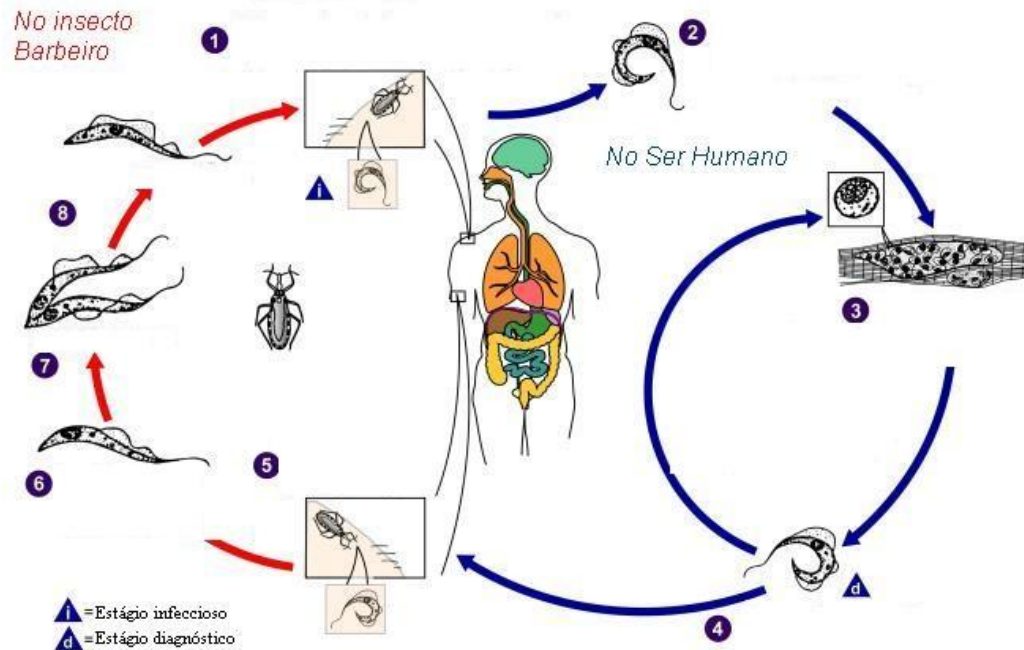


Figura 7: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (Abrahamsohn, IA www.eca.usp.br/njr/voxscentiae/ises_almeida_48.htm)

2.3 Tratamento

A abordagem terapêutica da doença de Chagas depende da fase clínica na qual se encontra o enfermo – aguda ou crônica. No primeiro caso, a principal ação é o emprego dos fármacos tripanocidas – nifurtimox (Figura 8) e benzonidazol (Figura 9) – com o objetivo de erradicar a infecção, evitando-se, assim, a evolução para a fase crônica, a qual poderá cursar com graves alterações (BRASIL, 2005).

O tratamento etiológico é urgentemente indicado na fase aguda e reativação (imunossupressão). Neste momento, a taxa de cura parasitológica é de quase 100% e diminui com a longa duração da doença/infecção. Nos jovens, a prevalência de efeitos colaterais é baixa. O tratamento etiológico também é indicado nas infecções congênitas e no início da fase crônica. Nos adultos, especialmente naqueles com a forma indeterminada, o tratamento etiológico poderia ser proposto, mas balanceando os potenciais benéficos (para prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença de Chagas) contra o longo tratamento programado com frequentes efeitos colaterais. As principais contra-

indicações são a gravidez, insuficiência hepática ou renal, especialmente o nifurtimox, que pode causar desordens neurológicas e psiquiátricas, como a epilepsia (WHO, 2009).

Nifurtimox e benzonidazol foram introduzidos na clínica médica nas décadas de 1960-70 e não são considerados medicamentos ideais para o tratamento da doença de Chagas devido a uma série de fatores como baixa eficácia na fase crônica da doença; significativas variações regionais na eficácia, devido ao surgimento de resistência ao *T. cruzi*; alta taxa de abandono do tratamento devido aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos; longo período de tratamento (30 a 60 dias); necessidade de monitoramento sob supervisão médica especial. Em países pobres, onde não é possível estabelecer programas de detecção em massa e o tratamento é muito caro, crianças com menos de 12 anos são normalmente as únicas a receberem o tratamento por serem menos prováveis a desenvolverem lesões crônicas (DNDi, 2009).

Nifurtimox, um derivado nitrofurano, de nome comercial Lampit® (Bayer 2503, Leverkusen, Alemanha) tem sido extensivamente utilizado por mais de três décadas, mas atualmente não é mais recomendado em vários países, incluindo o Brasil. O mecanismo de ação do nifurtimox ocorre pela redução do fármaco pela nitrorredutase a um radical nitroânion que reage com o oxigênio para formar ânions super-óxidos rapidamente catalisados a H_2O_2 pela superóxido-dismutase. O acúmulo desta última molécula pode gerar radicais hidroxila altamente tóxicas ao protozoário (URBINA e DOCAMPO, 2003; MARIN-NETO et al, 2009).

Benzonidazol, um derivado nitroimidazol com atividade contra as formas tripomastigota e epimastigota, é localmente produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), antes foi produzido pela Roche com o nome Radanil® ou Rochagan®. Ele foi introduzido no mercado, em 1971, e tem sido largamente utilizado como um agente efetivo para terapia antiparasitária nos casos agudos ou subagudos da doença de Chagas, incluindo transfusões e doenças adquiridas em laboratório e reativação da infecção em transplantados e outros pacientes imunossuprimidos (MARIN-NETO et al, 2009). O mecanismo de ação do benzonidazol ocorre possivelmente a geração de metabólitos ativos nitrorreduzidos do benzonidazol, principalmente pela citocromo P450 redutase, como também pela xantina oxidoreductase, aldeído-oxidase e por outras enzimas do citocromo P450, os quais são capazes de se ligar covalentemente a lipídios e proteínas, tanto do parasito quanto do hospedeiro (SIQUEIRA-BATISTA e GOMES, 2005; TAVARES, 2006) .

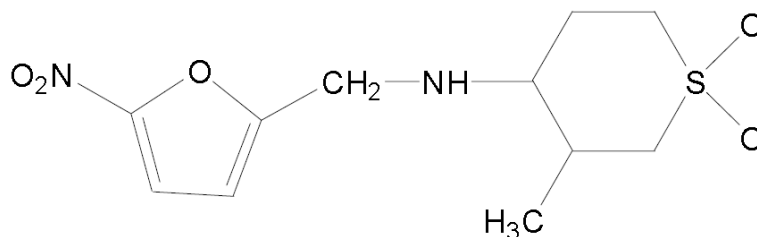


Figura 8: Nifurtimox: 3-methyl-*N*-[(1*E*)-(5-nitro-2-furyl)methylene] thiomorpholin-4-amine 1,1-dioxide (Coura, 2002)

Por ser melhor tolerado pelo organismo, o benzonidazol é o medicamento mais utilizado na linha de frente no tratamento. Apesar disso, a tolerância individual varia, se um composto precisa ser descontinuado, o outro pode ser utilizado como alternativa. O tratamento recomendado para a fase aguda, infecção congênita ou fase crônica com menos de 10 anos é 8-10mg/Kg/dia do nifurtimox e 5-7,5mg/Kg/dia do benzonidazol, ambos divididos em duas a três vezes por dia durante 60 a 120 dias (CRAIK et al, 2009, BERN et al, 2007). Os efeitos colaterais, adversos ou tóxicos causados por ambos os medicamentos ao organismo são inúmeros dentre eles podemos citar: pelo benzonidazol – dermatopatias por hipersensibilidade, febre e linfadenopatia, polineuropatia periférica, ageusia e depressão da medula óssea, distúrbios gastrintestinais, cefaléias e tonturas (BRASIL, 2005). Já o nifurtimox pode causar: mialgia e parestesia derivadas de polineurite periférica, distúrbios gastrintestinais, perda de peso, fraqueza, reações de hipersensibilidade (dermatites), cefaléia e distúrbios neurológicos (BRASIL,2004).

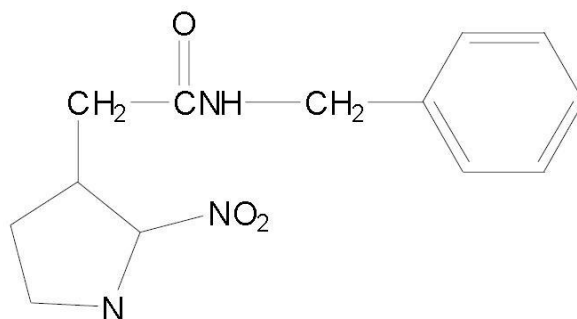


Figura 9: Benzonidazol: *N*-benzyl-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)acetamide (Coura, 2002)

2.4 Novas Perspectivas Terapêuticas

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), a Química Medicinal ou Química Farmacêutica é uma disciplina que envolve essencialmente a área da Química, Biologia, Medicina e Farmácia. Ela está relacionada com a invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de substâncias com atividade biológica, bem como o estudo de seu

metabolismo, interpretação de seu mecanismo de ação biológica a nível molecular, e construção de relações entre estrutura e atividade (IUPAC, 2009).

Considerando que a quimioterapia específica para a Doença de Chagas possui enormes limitações, a pesquisa de novas alternativas terapêuticas se torna imperiosa. Neste sentido, utilizando abordagens na área de Química Medicinal, foram desenvolvidos vários trabalhos na busca de moléculas bioativas contra o *T. cruzi*.

A Organização Mundial de Saúde definiu o perfil para um agente anti-*T. cruzi* ideal, o qual inclui alguns elementos fundamentais: (i) eficácia por via oral contra o parasita nas fases aguda, indeterminada e crônica da doença de Chagas; (ii) regime de tratamento completo em uma única ou poucas doses; (iii) baixo custo; (iv) acessível aos pacientes; (v) ausências de efeito colateral ou teratogênico; (vi) tratamento domiciliar; e (vii) não induzir ao fenômeno de resistência (COURA e CASTRO, 2002; CRAIK et al, 2009).

Desde a descoberta da doença de Chagas, em 1909, vários compostos já foram utilizados para o tratamento da doença. Entre eles cita-se o Atoxyl (composto contendo arsênio), fucsina (corante) tártaro emético (antimonial) e cloreto de mercúrio empregados experimentalmente por Meyer e Rocha Lima, em 1912, e todos eles sem efeitos (COURA e CASTRO, 2002). Entre os agentes quimioterápicos empregados até 1962, destacam-se os antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsênicos, fenantridinas, sais de ouro, cobre e estanho, iodeto de sódio, violeta genciana, aminopterina, ácido para-amino salicílico, hidrazida do ácido nicotínico, anti-histamínicos, sulfonamidas, ACTH, cortisonas, derivados da estilomicina, anfotericina B, mais de 30 antibióticos e alguns nitrofuranos (COURA e SILVA, 1961; BRENER, 1968; CANÇADO, 1968). Depois da introdução do nifurtimox e do benzonidazol, poucos compostos foram testados com pacientes chagásicos como, por exemplo, o alopurinol – atua como um substrato alternativo da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase que está incorporada no RNA, levando a formação de novos nucleotídeos e ao bloqueio da síntese de novas purinas (MARR, 1991) O cetoconazol foi um dos primeiros imidazóis a demonstrarem atividade *in vitro* contra o *T. cruzi* com acumulação de metabólitos do metabolismo de esterol em epimastigotas. Fluconazol e itraconazol têm seus mecanismos de ação contra *T. cruzi* interferindo na síntese de ergosterol (DE CASTRO, 1993).

Após 1992/1993, novas propostas de compostos foram apresentadas dentre elas: moléculas sintéticas (derivados de tiadiazinas, de 1-2-5-oxadiazol-N-óxidos, de acridinas, de nitroimidazóis, de nitrofuranos, de fenotiazinas, de compostos e complexos metálicos, de dinitroanilinas, de produtos naturais) (COURA e CASTRO, 2002).

Por outro lado, um dos grandes problemas ocasionados pela doença de Chagas é a cardiopatia, em especial a cardiomiopatia chagásica crônica. Neste sentido, o coração é um potencial alvo para a medicina regenerativa utilizando células-tronco, através técnicas de terapia celular. Estudos com modelos animais e clínicos vêm demonstrando um caminho promissor para a terapia celular em pacientes cardíacos, porém várias perguntas necessitam serem respondidas para uma maior efetividade desta terapia. Outro ponto a ser considerado é que a utilização de células-tronco não traria a cura aos portadores de Doenças de Chagas, apenas serviria para reparar as agressões causadas ao miocárdio e possibilitaria ao indivíduo conviver com o parasito sem sintomatologia (FIOCRUZ-SOARES e SANTOS, 2009).

2.5. Tiazolidinas

As tiazolidinas representam uma importante classe de moléculas que possuem uma grande variedade de atividades biológicas em virtude da capacidade de interagirem com os sistemas biológicos.

O anel heterocíclico pentagonal presente na tiazolidina (Figura 10) é um “scaffold” que pode ser associado a várias atividades biológicas (SARAF, 2008).

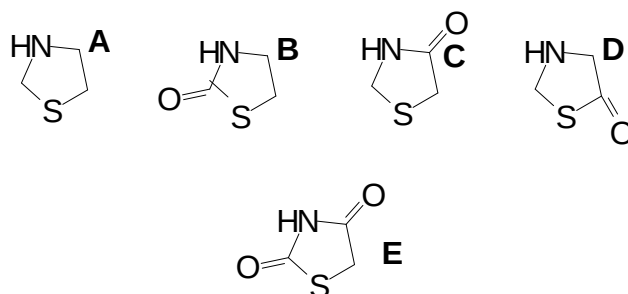


Figura 10: Subestruturas baseadas na tiazolidina A = Tiazolidina; B = Tiazolidin-2-ona; C = Tiazolidin-4-ona; D = Tiazolidin-5-ona; E = Tiazolidina-2,4-diona (Saraf, 2008)

Por sua vez, a funcionalização das tiazolidinas conduz à moléculas da série 4-tiazolidinona, que são caracterizadas pela presença de um grupo carbonila na posição 4-. Diversos substituintes nas posições 2-, 3- e 5- podem ser introduzidos na molécula. Entretanto, as mais importantes diferenças na estrutura e propriedades são exercidas por grupos quando ligados ao átomo de carbono da posição 2- (R e R' em posição 2- ou X em posição 3-). Adicionalmente, variações nos substituintes ligados ao átomo de nitrogênio e ao átomo de carbono metilênico são possíveis para as estruturas representadas por 2- e 3- (Figura 11).

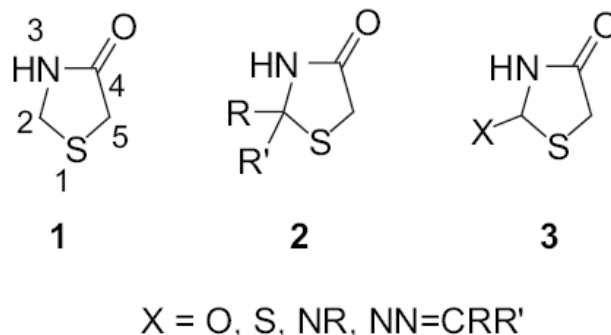


Figura 11: Anel tiazolidinônico e possibilidades de substituições

Entre as atividades biológicas dos derivados da tiazolidina citadas na literatura encontram-se: antiinflamatória (inibição da COX) (VANE, 1987; FU, 1990; DUBOIS, 1998. PREVITERA, 1990; DIROSA, 1971; CUZZOCREA, 1998; OTTANA, 2005), anticonvulsivante (SHYAM, 1972; KUMAR, 1970; DWIVEDI, 1972; PARMAR, 1972), hipnótica (CHAUDHARY, 1974; CHAUDHARY, 1976), antitubercular (TURKEVICH, 1972; FRENCH PATENT, 1973; LITVINCHUK, 1964; KAPUTAYAK, 1965; FUJIKAWA, 1969; ZUBENKY, 1974; DANILA, 1979; BABAOGLU, 2003; KOLOMOITSEV, 1970; CAVALLERI, 1977; MOUSSERON, 1972), antibacteriana (MANDLIK, 1966; MOHAN, 1972; KAVITHA, 2006; BONDE, 2004; BONDOCK, 2007, BONDOCK, 2006; VICINI, 2006), anti-helmíntica (McGUIRE, 1966; BRODY, 1971; FRENCH PATENT, 1975; GIRAUDON, 1973; ARIES 1974; ARIES, 1976), cardiovascular (NAGAR, 1973; MOMBER, 1999), anticâncer (GUDUDURU, 2004; DEXTER, 1979; BRATTAIN, 1981; FOGH, 1975; TOMPKINS, 1974; NCI, 1996; HIS, 2000; SHUREIQI, 2000; PYO, 2001; OTTANA, 2005); anti-histamínica (antagonista de receptores H1) (NARUTO, 1985; BOREA, 1986; DIURNO, 1992; SINGH, 1994; AGRAWAL, 2000; DIURNO, 1999; EMMET, 1982; WALCZYNSKI, 1999; WALCZYNSKI, 2000); antifúngica (SHARMA, 1967; SRIVASTAVA, 1969; MISRA, 1971; EDWARD, 1965; KATTI, 2005; DANDIA, 2006), antiviral (RAWAL, 2005), anti-hipertensiva (HARGRAVE, 1983), analgésica, anti-

reumática, antipirética (TSUJI, 1994) e anti-HIV (PARSONS JR, 1994; BOYCE, 1994), entre outras (SARAF, 2008; SAEED, 2008).

2.6. Mecanismo de Ação: o Papel do Grupo NO₂

Evidências indicam que o nifurtimox e benzonidazol atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (NO₂) presente nestas moléculas, e na maioria de nossos derivados tiazolidínicos, é reduzido ao grupo amino (NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroreduases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase (EC 1.6.2.4), leva à formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO₂[•]) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). No caso do nifurtimox, o radical reduz o oxigênio molecular (O₂) formando o íon superóxido (O₂^{•-}) e regenerando o grupo NO₂ num processo conhecido como ciclo redox (*redox cycling*) (DOCAMPO, 1981; MORENO, 1982; MASON, 1998; MAYA, 2003; MAYA, 2007). O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe-III, forma o radical hidroxila (•OH) (DÍAZ, 1988; ROMANHA, 2002). A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*. Por outro lado, o fármaco benzonidazol não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) (DOCAMPO, 1981; MORENO, 1982; MASON, 1998; MAYA, 2003; MAYA, 2007). O radical nitro formado pelo benzonidazol estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (e.g., DNA e citocromo P450) (DÍAZ, 1988).

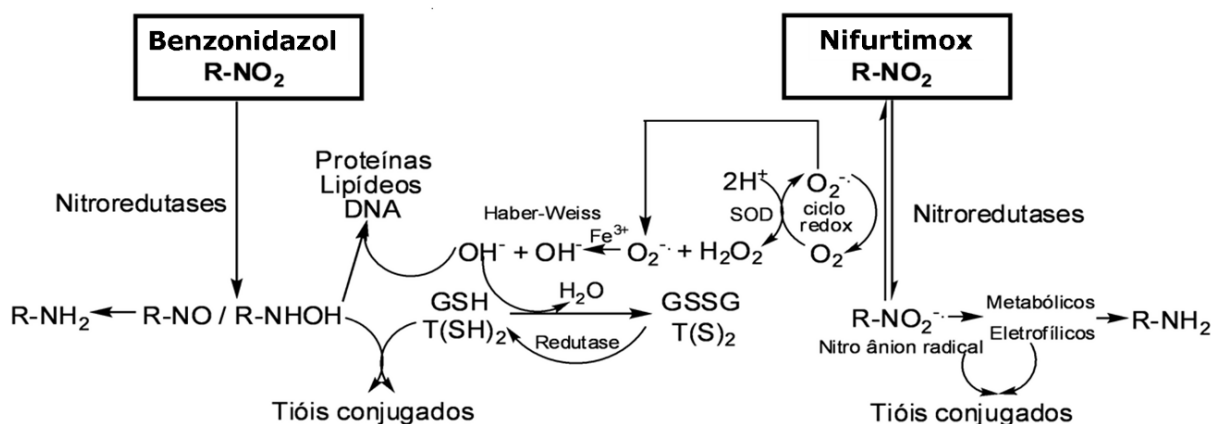


Figura 12: Mecanismo de ação proposto para os fármacos nifurtimox e benzonidazol (Dias, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Pesquisar novas moléculas tiazolidínicas com atividade frente ao *T. cruzi*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliação da atividade citotóxica de novas tiazolidinadionas em células esplênicas de camundongos isogênicos;
- Avaliação da atividade tripanocida de novas tiazolidinadionas em formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliação ultraestrutural da ação de novas tiazolidinadionas sobre a forma tripomastigota do *T. cruzi*.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo

Biological Evaluation of New Thiazolidines Derivatives against *Trypanosoma cruzi*

Artur Felipe Santos Barbosa^{a,c}, Valéria Rêgo Alves Pereira^b, Christina Alves Peixoto^b, Antonio Luiz Barbosa Pinheiro^c, Maria do Carmo Alves de Lima^a, Suely Lins Galdino^a, Ivan da Rocha Pitta^a

^a Departamento de Antibióticos/Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco

^b Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

^c Centro de Biofotônica/Faculdade de Odontologia – Universidade Federal da Bahia

Corresponding Authors: Tel: +55 081 2126 8347 / Fax: +55 081 2126 8346

E-mail: suelylinsgaldino@gmail.com

Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife - PE. CEP: 50670-901

ABSTRACT

Chagas' disease or American Trypanosomiasis is a serious public health problem and affects about 18 million people around the world. Like other neglected tropical diseases, treatment available for sufferers is scarce. Currently only two drugs are available, benznidazole and nifurtimox, both with serious side effects. Policies encouraging the development of new drugs and/or therapy has been stimulated by both the Special Program for Research and Training in Tropical Diseases and the Drugs for Neglected Diseases initiative. The present study evaluated the antichagasic potential of the new thiazolidines derivatives by the assessment of the cytotoxic effects on cells of isogenic mice; the trypanocidal activity against the trypomastigote and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*; and by Transmission electron microscopy. The results demonstrated antichagasic potential of the new thiazolidines derivatives at low cytotoxic concentrations on various parts of the parasite, inducing parasites to some pathways of cell death (apoptosis or autophagy). Possibly this action of the compound can be explained by the presence of the NO₂ group in its molecule. It may be concluded that the thiazolidines derivatives used on the present study may be used as anti-*Trypanosoma cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Thiazolidines; Transmission Electronic Microscopy; Chagas Disease; Anti-*Trypanosoma cruzi* *in vitro* activity

1. INTRODUCTION;

Chagas' disease was first described as a pathology in 1909 (Chagas, 1909). It is endemic only on the American Continent and it is caused by a flagellate parasite, the *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to humans primarily by blood-sucking triatomine insects and via blood transfusion (Moncayo and Silveira, 2009). Several millions of people infected by the *T. cruzi* may be living in North America, Europe and other countries as a result of immigration to these areas in search of better living conditions (Schmunis, 2007). One hundred years after its discovery, Chagas' disease remains epidemiologically relevant as it affects approximately 20 million people from southern United States to southern Chile; more than 90 million people live in areas of risk; and it has an incidence of approximately 200.000 new cases each year (Moncayo, 2009; Schmunis, 2007; Coura, 2007; Dias, 2007; Boiani et al, 2008). It remains one of the most important public health problems as well as economic treat in most countries of Latin America, as it is expected a around 21.000 death related to its complications (Schmunis, 2007; Sathler-Avelar et al, 2009; Rocha et al, 2009).

Despite significant advances on the understanding of both the biochemistry and physiology of its etiological agent, its current specific treatments are usually effective only on the acute phase. Once the disease progresses to later stages, there is no effective treatment and a rise of severe side effects associated with long-term treatments is observed (Bollini et al, 2009).

There are two drugs currently available for the treatment of Chagas' disease: Nifurtimox® (Nfx) and benznidazole® (Bnz). Nfx is a nitrofurane and Bnz is a nitroimidazole compound (Moreno et al, 1982). The use of these drugs to treat the acute phase of the disease is widely accepted. Despite, both Nfx and Bnz being able of either eliminate the parasitemia and to reduce serological titers on both acute and early chronic infections, they are not active against all *T. cruzi* strains and have significantly low efficacy in long-term chronic infections (El-Sayed et al, 2005; Berman, 2003).

Both drugs act via the reduction of the nitro group. In the case of Nfx, the reduction generates an unstable nitro anion radical that produces highly toxic reduced oxygen species. The side effects of this drug result from the oxidative damage in the host's tissues and are, thus, inextricably linked to its anti-parasitic activity (Gerpe et al, 2009). Benznidazole acts via reductive stress and involves covalent modification of macromolecules by nitro reduction intermediates (Coura and De Castro, 2002). However, their use in the treatment of patients

on chronic phase is controversial. The undesirable side effects of both drugs are major drawback of their use. Often, the physician needs to stop the treatment (Bollini et al, 2009). For these reasons the search of new drugs against this parasitic disease is essential and urgent (Solomon and Robert, 2003).

On the other hand, one of the main objectives of organic and medicinal chemistry is the design, synthesis and production of molecules valuable as human therapeutic agents (Verma and Saraf, 2008). The heterocyclic structures are receiving special attention as they belong to a class of compounds with proven utility in medicinal chemistry (Thompson and Ellman, 1996; Nefzi, et al, 1997; Frazen, 2000).

There are numerous biologically active molecules with five-membered rings, containing two heteroatoms (figure 1). Thiazolidine is considered an important scaffold to be associated to several biological activities (figure 1) (Barreca et al, 2001; Barreca et al, 2002; Goel and Kumar, 1999; Allen et al, 2004).

The objective of this study was to evaluate the trypanocidal action of new thiazolidine derivatives against trypomastigote and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, and identify by transmission electron microscopy, ultra-structures that were targets of action of the compounds tested.

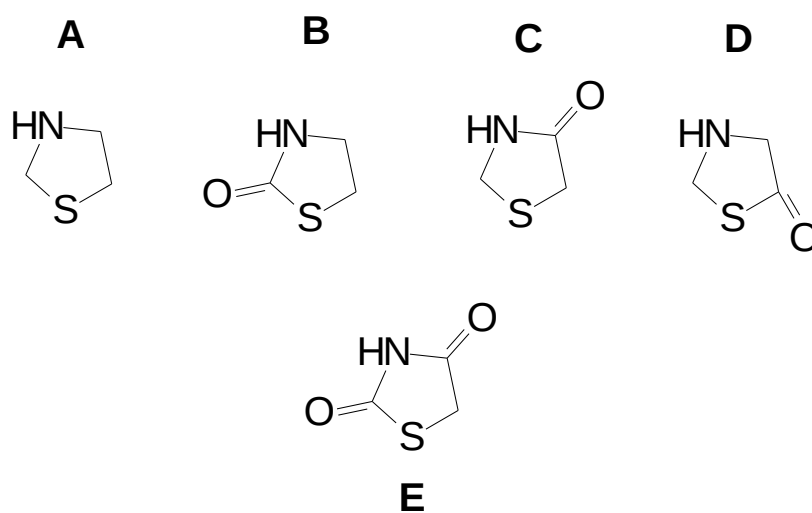


Figure 1: Substructures based on thiazolidine A - Thiazolidine; B - Thiazolidin-2-one; C - Thiazolidin-4-one; D - Thiazolidin-5-one; E - Thiazolidin-2,4-dione.

2. MATERIALS AND METHODS;

2.1 - Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds was determined using BALB/c mice splenocytes (5×10^6 cells/well), obtained by Pereira et al (2004), cultured in 96-well plates in RPMI 1640 (Sigma®, MO, USA) supplemented with 10% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 50 µg/mL of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil). Each compound (LPSF-SF 29; LPSF-GQ 109) was dissolved in DMSO and was evaluated for their ability to inhibit splenocyte's proliferation at six different concentrations (1, 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL). The experiments were carried out in duplicate. Cell proliferation was determined by adding 1 µCi of [^3H] – thymidine per well during 24 h at 37°C and 5% CO₂ environment (HF212UV, Shanghai Lishen Scientific Equipment, Shanghai – China). After this period, the content of the plate was harvested to determine the ^3H -thymidine incorporation using a beta-radiation counter (1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Co. LKB Wallace, Turku - Finland). The toxicity of each compound was determined by comparing the percentage of ^3H -thymidine's incorporation of drug-treated wells to untreated ones.

2.2- Parasites

2.2.1. – Trypomastigotes

Trypanosoma cruzi (Y-strains) trypomastigotes were obtained from the supernatant of 5–6 day-old infected Vero cells (Department of Immunology - Research Center Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brazil) maintained on a RPMI-1640 (Himedia Laboratories, Mumbai, India) medium supplemented with 2% fetal calf serum (FCS) for 5–6 days at 37° C in a 5% humidified CO₂ atmosphere. After this time, supernatant was collected, centrifuged at 500×g for 5 min and allowed to remain at 37° C for 30 min. During this period, trypomastigotes in the pellet moved into the supernatant medium, which was then collected and centrifuged (1000×g for 10 min). The trypomastigotes concentrated on the pellet were counted (LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Germany), and used in a concentration of 5×10^6 cells to infect a monolayer cell culture (host cells cultivated in 25 cm² culture flasks). After an incubation of 24 h, the culture medium was changed to remove free parasites and the host cells re-incubated (37° C, 5% humidified CO₂ atmosphere). The culture medium was changed at 48 h intervals.

2.2.2 – Epimastigotes

Epimastigote forms of Y-strain *T. cruzi* were axenically grown and maintained in complex medium containing 37 g L⁻¹ brain heart infusion (BHI; Difco®, MA, USA), 10 µg L⁻¹ hemin (Sigma®, MO, USA), 20 µg L⁻¹ folic acid (Sigma®, MO, USA), and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, BRL®) for 7 days at 28°C (Freire-de-Lima et al, 2008).

2.3- *In vitro* anti-*T. cruzi* activity assessment

The new thiazolidine derivatives were initially tested *in vitro* against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*. To determine the anti-proliferative effect of *T. cruzi* epimastigotes (10⁶/mL) were grown in axenic cultures. The cultures (100 µL), at the log phase of growth, were placed in 96-well plates at (26° C). The growth of both epimastigotes and trypomastigotes forms were assessed at both on the absence or presence of different concentrations of thiazolidine derivatives (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,1 µg/mL) for 11 days at 28°C for epimastigotes. Culture plates of trypomastigotes were incubated again at 37 °C in a 5% humidified CO₂ atmosphere for 24 hours. After this time, the counting of the parasites was performed to by hemocytometry (LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Germany). The IC₅₀ for each compound was calculated and compared to the control (no drug added to the medium). The determination was carried out by the comparison between the values of viable parasites counted by hemocytometry. Nfx and Bnz were used as the trypanosomicidal reference drugs.

2.4– Transmission Electronic Microscopy

Control and thiazolidine derivatives-treated trypomastigotes were fixed in 2.5% glutaraldehyde, in 0.1M cacodylate buffer, pH7.2; for 2 h at room temperature. The parasites were rinsed three time in 0.1M cacodylate buffer, and post-fixed in 1% OsO₄ plus 0.8% potassium ferrocyanide and 5mM calcium chloride in 0.1M cacodylate buffer, pH 7,2; for 1 h at room temperature. The parasites were then rinsed in PBS, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 (Sigma Company, St Louis, MO - USA). Ultra-thin sections obtained with a ultramicrotome were stained with uranyl acetate and lead citrate, and then photographed and analyzed in a FEI transmission electron microscope (Morgagni 268D, FEI Company, Hillsboro, Oregon – USA) (Bisaggio et al, 2006).

3 RESULTS;

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was performed with two thiazolidine' derivatives, being evaluated the potential toxicity of the molecules on animal cells. Each derivative was prepared in six dilutions (100; 50; 25; 10; 5 e 1 µg/mL) and kept during 24 hours in contact with splenocytes. The percentage of inhibition of incorporation of tritiated thymidine (³H-thymidine) to the genetic material of the splenocytes was determined by the comparison between the percentages of incorporation of ³H-Thymidine to treated and non-treated cells. Concentrations showing inhibition of the incorporation of ³H-thymidine of less than 30% compared to untreated controls were considered non-toxic to animal organisms (spleen cells of mice). The results of the present study showed that all tested thiazolidine' derivatives had no toxicity on splenocytes (Table 1).

In vitro anti-*T. cruzi* activity assessment

The *in vitro* assay anti-*T. cruzi* activity, thiazolidine's derivatives were evaluated against both trypomastigote and epimastigote forms of Y-strain of *T. cruzi*. The trypomastigotes and epimastigotes were incubated in the presence of nine different concentrations (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,1 µg/mL) of the thiazolidine' derivatives and subsequently a count viable parasites in a Neubauer chamber was carried out to determine the IC₅₀ for each compound. The compounds showed IC₅₀ values very close to those of the reference drugs (Nfx and Bnz) and may be seen on Table 1.

Table I – *In vitro* Biological characterization of thiazolidines derivatives

	IC _{50%} Epi	IC _{50%} Trypo	Cytotoxicity (µg/mL)	% inhibition
LPSF - GQ 109	NR	2,9	1	4,13
LPSF - SF 29	4,11	10,29	25	29,20
BNZ	1,73	1,63	25	25,38
NFX	0,54	0,79	1	26,52

Table 1: percentage of growth inhibition was determined comparing the percentage of the percentage of [³H] – thymidine incorporation of drug-treated wells in relation to untreated wells.

Transmission Electronic Microscopy

The EM study aimed to study possible morphological alterations caused by the thiazolidine' derivatives used on *T. cruzi*. For this, we evaluated the interaction of two compounds, LPSF-GQ 109 and LPSF-SF 29 against the trypomastigote form of *T. cruzi*. The concentrations used were 2.9 µg/mL for the LPSF-GQ 109 and 10.29 µg/mL for the LPSF-SF 29, concentrations corresponding to their IC₅₀ values for the trypomastigote forms.

Figure 2 shows the effects of the LPSF SF-29 on the trypomastigote form of *T. cruzi*. The figure (2A) present normal trypomastigotes form. We found both chromatin condensation and migration to the vicinity of nuclear envelope, which presented obvious structural disorganization (2B). Another finding was the presence of myelin bodies (2B). In (2C) was observed a prominent vacuolation within *T. cruzi*.

The GQ 109 caused several alterations on the morphology resembling those seen on a cell in treated parasites, as can be seen in the images of Figure 3. These alterations included the Increased volume of kinetoplast, changes in the morphology of mitochondria and presence of lipid bodies (3A); Super condensed nuclear chromatin (3B); Disintegration of the nuclear membrane and increased cinetoplasma (3C); Endoplasmic Reticulum (ER) fragmented (3D).

4 DISCUSSION;

The results of the present study showed that all tested thiazolidine' derivatives had no toxicity on splenocytes (Table 1). Compared with drug references, thiazolidine derivatives showed activity values, anti-*T. cruzi* very similar. Tests with new substituents to the scaffold thiazolidine are necessary to determine a better activity.

The alterations founded in figure (2B) may be indicative of a feature of a cell in apoptosis (Lockshin and Zakeri, 2004). Changes on mitochondrial complex (kinetoplast-mitochondria) were seen and consisted of the presence of blistering throughout its length. The mitochondrion is considered a key structure of the central mechanism of the control of programmed cell death (PCD). This change may indicate that the parasite is undergoing a PCD (2D) (Menna-Barreto et al, 2009). Another finding indicative of PCD induction by the LPSF SF-29 was the presence of myelin bodies (2B). The relationship between the presence of myelin structures and mitochondrial alterations within the parasite are characteristics of autophagic events (Sperandio et al, 2000).

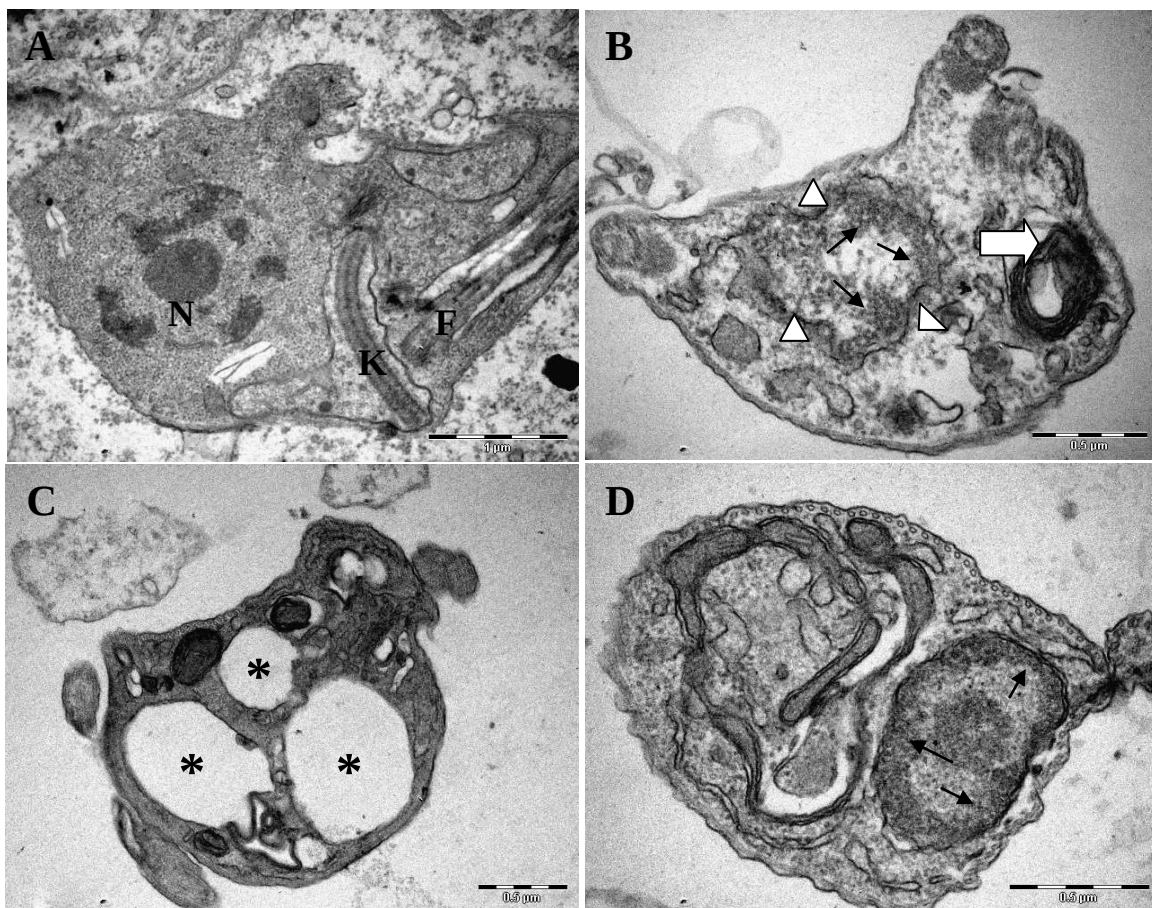


Figure 2: Thiazolidine derivative LPSF SF-29 causes major changes in the ultrastructure of trypomastigotes of *T. cruzi*. A- MET image of untreated parasites presenting typical morphology of normal (N) Nucleus, (K) Kinetoplast and (F) Flagele; B-D - MET images of parasites treated with 10.29 µg/mL LPSF-SF 29; B-presence of myelin structures (white arrow), disorganization of nuclear envelope (white triangle) and chromatin condensation (thin arrow); C - Prominent vacuolation (black asterisk); D - Changes in mitochondrial complex (white asterisks) and perinuclear chromatin condensation (thin arrow).

The disarrangement of cytosolic membranes (presence of autophagic-like structures; increase in size of kinetoplast-mitochondria; and the appearance of concentric membranous structures within the organelles observed on the present investigation are very similar to an inhibitory effect of the lipid biosynthesis (3A) (Santa-Rita et al, 2005; Lazard et al, 1990; Vivas et al, 1996; Braga et al, 2004). The changes observed within the parasites treated with the GQ LPSF-109 seemed to affect the biophysical properties of the parasite, which may lead to lysis of the parasite (Menna-Barreto et al, 2009).

Another alteration observed that might corroborate the hypothesis that the LPSF GQ-109 may act as an inhibitor of the lipid biosynthesis was seen on organelles visualized at low electron density. The decrease in electron density observed may suggest a possible interference on the lipid content and the accumulation of macromolecules (Cunha-e-Silva et

al, 2002). Pre-lysosomal compartments represent the crucial storage of lipids and proteins in the parasite (3A) (Soares, 1999). Possibly, these changes on the content of reservossomo, is related to the impairment of the biosynthesis of lipids in trypomastigotes of *T. cruzi*. However, further tests are needed to corroborate this hypothesis.

Autophagic cell death involves the activation of the autofagossomal-lysosomal system (Bursch, 2001). Autophagosomes are double membrane vesicles responsible for the globbing of cytoplasmic constituents during changes of organelles. After the fusion of autophagosomes to the lysosome, an autophagosome is formed, in which cellular debris is digested (Menna-Barreto et al, 2009). Globbing was caused by LPSF GQ-109 (Figure 3).

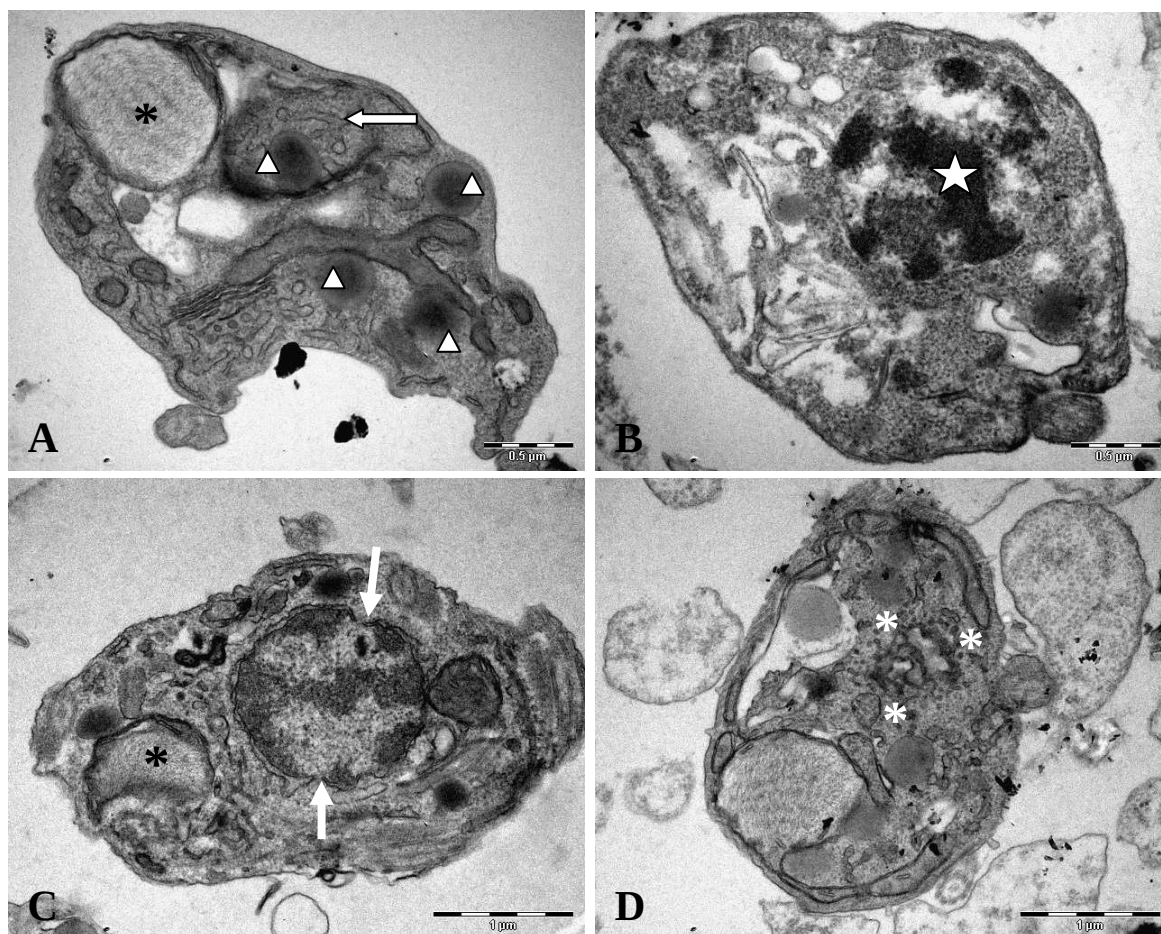


Figure 3: Thiazolidine derivative LPSF GQ-109 causes significant changes in the ultrastructure of tripomastigotes *T. cruzi*. A - Increased volume of kinetoplast (black asterisk), changes in the morphology of mitochondria (white arrow) and presence of lipid bodies (white triangles); B - Super condensed nuclear chromatin (white star) similar to an apoptotic process; C - Disintegration of the nuclear membrane (white arrows) and increased cinetoplasma (black asterisk); D - Endoplasmic Reticulum (ER) fragmented (white asterisk). Bar_{A,B} = 0,5 µm / Bar_{C,D} = 1 µm

Molecules containing the thiazolidine nucleus may be promising against *Trypanosoma cruzi*. The action of the compound LPSF SF-29 on the ultrastructure of *T. cruzi* was quite

satisfactory, whereas, the dose of the compound was well below the toxic concentration that it has on animal cells. Possibly this action of the compound LPSF SF-29 can be explained by the presence of the NO₂ group in its molecule, thus generating reactive oxygen species or generating peroxides within the parasite (Dias et al, 2009).

Our results lead us to conclude that both LPSF-SF 29 and LPSF-GQ 109 induces one or more pathways of cell death (apoptosis or autophagy) on trypomastigote form of *T. cruzi* and they may be promising compounds against *Trypanosoma cruzi*.

ACKNOWLEDGEMENTS;

The authors would like to thank Grupo de Pesquisa em Inovações Terapêuticas (GPIT - UFPE), and the FACEPE for partial financial supports and scholarship to Artur Barbosa. We thank to Dra. Christina Peixoto, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz, for performing helpful in the electronic microscopy. We thank Dr. Antonio Pinheiro for providing language help and new works with GPIT.

REFERENCES;

Allen, S., Newhouse, B., Anderson, A.S., Fauber, B., Allen, A., Chantry, D., Eberhardt, C., Odingo, J., Burgess, L.E., 2004. Discovery and SAR of trisubstituted thiazolidinones as CCR4 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1619-1624.

Barreca, M.L., Balzarini, J., Chimirri, A., De Clercq, E., De Luca, L., Höltje, H.D., Höltje, M., Monforte, A.M., Monforte, P., Pannecouque, C., Rao, A., Zappalà, M., 2002. Design, Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Molecular Modeling Studies of 2,3-Diaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as Potent Anti-HIV. *Agents J. Med. Chem.* 45, 5410-5413.

Barreca, M.L., Chimirri, A., De Luca, L., Monforte, A., Monforte, P., Rao, A., Zappalà, M., Balzarini, J., De Clercq, E., Pannecouque, C., Witvrouw, M., 2001. Discovery of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1793-1796.

Berman, J., 2003. Current treatment approaches to leishmaniasis *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 397.

Bisaggio, D.F.R., Campanati, L., Pinto, R.C.V., Souto-Padrón, T., 2006. Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: Changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Tropica* 98, 162–175.

Boiani, L., Davies, C., Arredondo, C., Porcal, W., Merlino, A., Gerpe, A., Boiani, M., Pacheco, J. P., Basombrío, M. A., Cerecetto, H., González, M., 2008. *In vivo* studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease. *Eur J Med Chem* 43, 2229-2237.

Bollini, M., Casal, J.J., Alvarez, D.E., Boiani, L., Gonzáles, M., Cerecetto, H., Bruno, A.M., 2009. New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorg Med Chem* 17, 1437–1444.

Chagas, C., 1909. Nova Tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanun cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1, 159-218.

Coura, J.R., 2007. Chagas Disease: what is known and what is needed – a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 113 – 122.

Coura, J.R., De Castro, S. L., 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 3.

Dias, J.C.P., 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas Disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 11- 18.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., Da Silveira, J. F., De Jong, P.; Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G.,

Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., Andersson, B., 2005. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309, 409.

Frazen, R.G., 2000. Recent Advances in the Preparation of Heterocycles on Solid Support: A Review of the Literature *J. Comb. Chem.* 2, 195.

Freire-de-Lima, L., Ribeiro, T.S., Rocha, G.M., Brandão, B.A., Romeiro, A., Mendonça-Previato, L., Previato, J.O., De Lima, M.E.F., De Carvalho, T.M.U., Heise, N., 2008. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms *Parasitol Res* 102, 1059–1067.

Gerpe, A., Álvarez, G., Benítez, D., Boiani, L., Quiroga, M., Hernández, P., Sortino, M., Zacchino, S., González, M., Cerecetto, H., 2009. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7500–7509.

Goel, B., Kumar, A., 1999. 2-Substituted-3-(4-bromo-2-carboxyphenyl)-5-methyl-4-thiazolidinones as potential anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* 34, 265-269.

Moncayo, A., Silveira, A.C., 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 17 – 30.

Moreno, S. N., Docampo, R., Mason, R.P., Leon, W., Stoppani, A.O., 1982. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 585.

Nefzi, A., Ostresh, J.M., Houghten, R.A., 1997. The Current Status of Heterocyclic Combinatorial Libraries. *Chem. Rev.* 97, 449;

Pereira, V.R.A., Lorena, V.M.B., Galvao-da-Silva, A.P., Coutinho, E.M., Silva, E. D., P. Ferreira, A. G., Miranda, P., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Soares, M.B.P., Correa-Oliveira, R., Gomes, Y.M., 2004. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. *Parasitology*. 129, 563–570.

Rocha, M.O.C., Nunes, M.C.P., Ribeiro, A.L., 2009. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 159 – 166.

Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, A.M., Carvalho, A.T., Martins-Filho, O.A., 2009. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 246 – 251.

Schmunis, G.A., 2007. Epidemiology of Chagas Disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 75 – 85.

Solomon, N., Robert, G.R., 2003. *Nat. Rev.* 2, 919-928.

Thompson, L.A., Ellman, J.A., 1996. Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. *Chem. Rev.* 96, 555.

Verma, A., Saraf, S.K., 2008. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. *Eur J Med Chem* 43, 897-905.

4.2. OUTROS RESULTADOS

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com 12 compostos tiazolidínicos, sendo avaliado o potencial de toxicidade das moléculas sobre células animais. Cada derivado tiazolidínico foi preparado em seis concentrações (100; 50; 25; 10; 5 e 1 µg/mL), por 24 horas, na presença de esplenócitos. O percentual de inibição da incorporação da timidina tritiada (^3H -Timidina) ao material genético dos esplenócitos foi determinado comparando-se o percentual de incorporação da ^3H -Timidina às células tratadas com os derivados tiazolidínicos em relação ao percentual de incorporação da ^3H -Timidina às células sem tratamento. As concentrações que apresentaram uma inibição na incorporação de ^3H -Timidina inferior a 30% em relação ao controle não tratado foram considerados atóxicos a organismos animais (células esplênicas de camundongo), sendo utilizadas como parâmetros para os testes seguintes. Concentrações que indicaram uma inibição na incorporação de ^3H -Timidina superior a 30% foram consideradas tóxicas em nosso trabalho (Tabela I). Nas condições experimentais utilizadas, os resultados obtidos demonstraram que os compostos tiazolidínicos não apresentam toxicidade para esplenócitos.

Nos ensaios de atividade antiparasitária os derivados tiazolidínicos foram testados para se avaliar o potencial contra parasitos de *T. cruzi*. Várias atividades já foram descritas na literatura para moléculas da série tiazolidinadiona, porém a atividade antiparasitária ainda não havia sido relatada.

Os compostos inicialmente testados no ensaio de citotoxicidade foram então avaliados de modo *in vitro* contra a forma infectante tripomastigota metacíclicas do *T. cruzi*, cepa Y, para se determinar seu potencial anti-*T. cruzi*. Os tripomastigostas foram incubados na presença de 9 diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,1 µg/mL) de todos os 12 derivados tiazolidínicos disponíveis e posteriormente foi feita a contagem de parasitos viáveis em câmaras de Neubauer para em seguida se realizado o IC_{50} (metade da concentração inibitória máxima de um composto) de cada composto. Como controle positivo foram utilizados os fármacos disponíveis no mercado contra a Doença de Chagas: o nifurtimox e o benzonidazol. Os resultados foram expressos na Tabela I.

Os compostos foram testados *in vitro* contra a forma epimastigota do *T. cruzi*, cepa Y, foram incorporados nas mesmas nove concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,1 µg/mL) que as formas tripomastigotas foram testadas, para com isso se determinar o potencial de letalidade dos compostos em relação a letalidade gerada pelos compostos padrões. E o IC_{50} só foi determinado para os compostos com estabilidade estatísticas nos resultados.

Os demais compostos apresentaram um IC₅₀ inferior a máxima concentração atóxica segura a ser utilizada em organismos animais, demonstrando potencial atividade contra *T. cruzi*. Em comparação com as drogas padrões, os derivados tiazolidínicos com os melhores resultados ainda não apresentaram valores melhores que as drogas padrões disponíveis no mercado, levando-nos a pensar em outros substituintes ao “scaffold” tiazolidínico.

O percentual de inibição da incorporação da timidina tritiada ao material genético dos esplenócitos, foi determinado comparando-se o percentual de incorporação da timidina tritiada às células tratadas com os derivados tiazolidínicos em relação ao percentual de incorporação da timidina às células sem tratamento.

Tabela I – Caracterização biológica *in vitro* dos derivados tiazolidínicos

	IC ₅₀ % Epi	IC ₅₀ % Tripo	Citotoxicidade (µg/mL)	% inibição
GQ 32	NR	ND	5	21,91
GQ 77	ND	ND	25	18,45
GQ 98	NR	ND	25	29,91
GQ 109	NR	2,9	1	4,13
GQ 116	-	5,33	10	20,76
SF 17	28	ND	50	16,58
SF 22	10,11	ND	10	14,83
SF 24	ND	ND	25	16,24
SF 25	16,83	ND	25	0
SF 27	24,36	ND	1	20,59
SF 29	4,11	10,29	25	29,20
SF 31	ND	ND	25	26,68
BNZ	1,73	1,63	25	25,38
NFX	0,54	0,79	1	26,52

Tabela 1: **NR** – Não Realizado; **ND** – Não Determinado

Nos estudos conduzidos pela microscopia eletrônica, observou-se as principais estruturas modificadas pelos compostos tiazolidínicos sobre o *T. cruzi*. Para isso avaliamos a interação de dois

compostos, o GQ 109 e o SF 29 contra a forma tripomastigota do *T. cruzi*. As concentrações utilizadas foram 2,9 e 10,29 µg/mL para o GQ 109 e o SF 29 respectivamente.

As imagens abaixo (figura 13) demonstram os efeitos do composto LPSF-SF 29 sobre a forma infectante tripomastigota do *T. cruzi*. Uma das alterações observadas através foi a condensação da cromatina e sua migração para as proximidades da carioteca a qual apresenta evidente desorganização estrutural, indicando, segundo Lockshin 2004, características de uma célula em um processo de apoptose.

O complexo mitocondrial (mitocôndria-cinetoplasto) sofreu modificações causadas pelo LPSF-SF 29) com formação de vesículas por toda a sua extensão. A mitocôndria mostra-se como um posto central no controle do mecanismo de morte celular programada (PCD), e sua alteração após a administração de compostos com características tripanocida, é um indicativo que a célula do parasito está sofrendo uma PCD (figura 13) (MENNA-BARRETO, 2009).

Outro achado que indica o efeito indutor do LPSF-SF 29 a uma PCD foi a constatação da presença de corpos mielínicos (figura 13). Esta relação entre a presença de estruturas mielínicas e alterações mitocondriais no interior do parasito são características de eventos autofágicos (SPERANDIO, 2000).

:

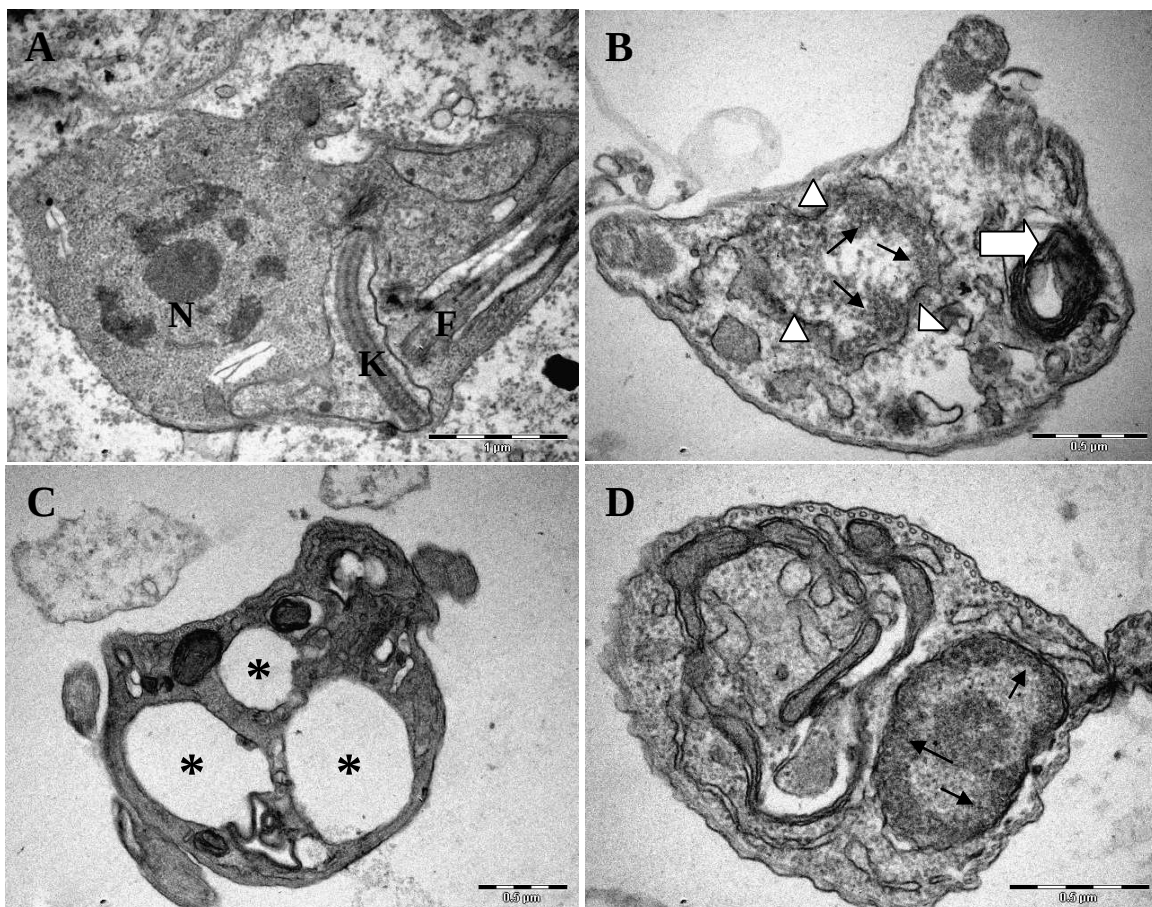


Figura 13: Derivado tiazolidínico LPSF-SF 29 causa mudanças importantes na ultra-estrutura de tripomastigotas de *T. cruzi*. A – imagem de MET parasitos não tratados apresentando morfologia normal típica de (N) Núcleo, (K) Cinetoplasto e (F) Flagelo; B-D – imagens de MET de parasitos tratados com 10,29 $\mu\text{g/mL}$ de LPSF-SF 29; B- presença de estruturas mielínicas (seta branca), desarranjo da carioteca (triângulo branco) e condensação da cromatina (seta fina); C – Proeminentes vacuolizações (asterisco preto); D – Alterações no complexo mitocondrial (asteriscos brancos) e condensação perinuclear da cromatina (seta fina). $\text{Bar}_A = 1\mu\text{m}$ / $\text{Bar}_{B,C,D} = 0,5\mu\text{m}$.

O composto LPSF-GQ 109 também demonstrou uma série de efeitos sobre os parasitos (figura 14) tratados com alterações morfológicas assemelhando-se a uma célula em PCD com desintegração das organelas citoplasmáticas e núcleo, bem como inchaço do cinetoplasto e anomalias na mitocôndria. (SANTOS, 2006)

A disposição das membranas citosólicas assemelha-se a estruturas autofágicas, aumento do cinetoplasto-mitocôndria e aparecimento de estruturas concêntricas membranosas dentro das organelas são muito similares ao efeito inibidor da biossíntese lipídica (figura 14). (SANTA-RITA, 2005; LAZARDI, 1990; VIVAS, 1996; BRAGA, 2004). As modificações observadas no interior dos parasitos tratados com o LPSF-GQ 109 parecem afetar as propriedades biofísicas do parasito, o qual poderia levar a lise do organismo tratado (MENNA-BARRETO, 2009)

Outra alteração observada que pode vir a corroborar com a hipótese da ação do LPSF-GQ 109 como inibidor da biossíntese lipídica é que também foram visualizadas organelas com uma baixa densidade eletrônica. Estes compartimentos pré-lisossomais representam o armazenamento crucial de lipídeos e proteínas no parasito (figura 14) (SOARES, 1999). A diminuição da densidade eletrônica observada pela microscopia sugere uma possível interferência no conteúdo lipídico e no acúmulo de macromoléculas. (CUNHA E SILVA, 2002). Possivelmente, estas modificações no conteúdo do reservossomo relaciona-se com o comprometimento da biossíntese de lipídeos em tripomastigotas de *T. cruzi*, entretanto novos ensaios são necessários para a comprovação desta hipótese.

A morte celular autofágica envolve o sistema autofagossomal-lisossomal (BURSCH, 2001). Autofagossomo são vesículas de dupla membrana responsável pelo englobamento de constituintes citoplasmáticos, durante as modificações das organelas. Depois da fusão do autofagossomo ao lisossomo, um autofagolisossomo é formado, no qual resíduos celulares são digeridos. (MENNA-BARRETO, 2009).

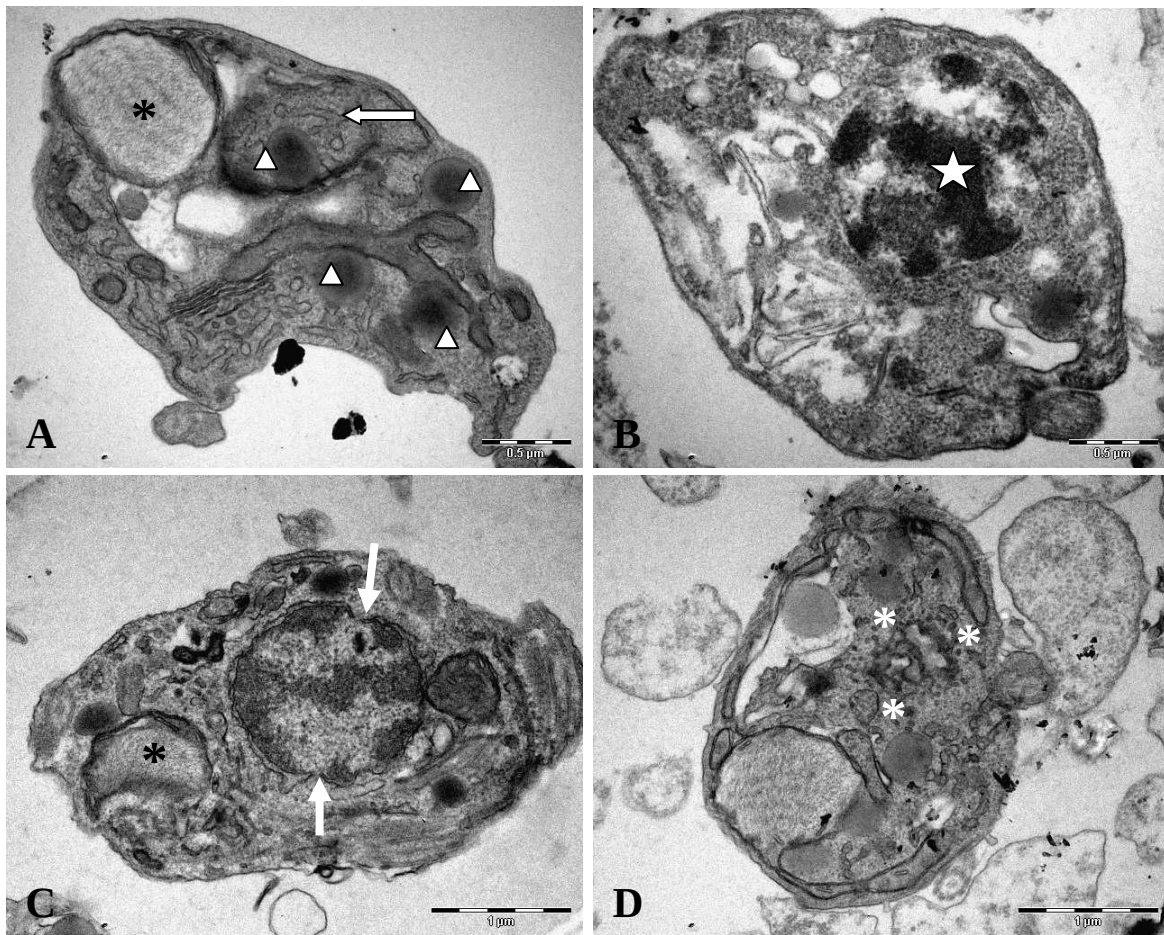


Figura 14: Derivado tiazolidínico LPSF-GQ 109 causa mudanças importantes na ultra-estrutura de tripomastigotas de *T. cruzi*. A – Aumento do volume do cinetoplasto (asterisco preto), alterações na morfologia da mitocôndria (seta branca) e presença de corpos lipídicos (triângulos brancos); B – Cromatina nuclear super condensada (estrela branca) semelhante a um processo apoptótico; C - Desintegração da membrana nuclear (setas brancas) e aumento do cinetoplasma (asterisco preto); D – Retículo Endoplasmático fragmentado (asterisco branco) Bar_{A,B} = 0,5 µm / Bar_{C,D} = 1 µm

5. CONCLUSÃO

Moléculas contendo o núcleo tiazolidínico demonstraram serem promissoras contra o *Trypanosoma cruzi*. A ação do composto LPSF-SF 29 sobre as ultra-estruturas do *T. cruzi* foi bem satisfatória, visto que, a dose utilizada do composto foi bem a baixo da concentração tóxica que o mesmo possui sobre células animais. Possivelmente esta ação do composto LPSF-SF 29 pode ser explicada pela presença do grupo NO₂ em sua molécula, gerando assim, espécies reativas de Oxigênio ou gerando peróxidos no interior do parasito. Com as imagens de MET, pode-se dizer que o composto LPSF-SF 29 induz a forma infectante de *T. cruzi*, tripomastigota, a uma ou mais caminhos de morte celular (apoptose ou autofagia). A regulação e modulação dos caminhos de morte celular são pouco compreendidos, merecendo novos estudos para um maior entendimento. Estudos mais aprofundados serão necessários para determinação do mecanismo de ação das moléculas de forma mais precisa, bem como a otimização estrutural visando a identificação de produtos mais ativos.

6. PERSPECTIVA

Com os resultados apresentados neste trabalho, torna-se interessante mais investigações da atividade de tiazolidinas contra os protozoários do *Trypanosoma cruzi*. Novas moléculas e ensaios mais aprofundados, e testes mais criteriosos tornam-se necessários para se determinar a rota de ação dos compostos. Ensaios *in vivo* podem ajudar a entender o comportamento dos novos derivados tiazolidínicos acompanhado da fisiologia do animal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADADE, C.M. et al. Ultrastructural localization of *Trypanosoma cruzi* lysosomes by aryl sulphatase cytochemistry. *Micron* v. 38, p. 252-256, 2007.
- AGRAWAL, V.K.; SACHAN, S.; KHADIKAR, P.V. QSAR studies on antihistaminic activity of some thiazolidine-4-ones. *Acta Pharmaceutica* v.50, p. 281-290, 2000.
- ARAÚJO, A. et al. Paleoparasitology of Chagas Disease – A Review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* v.104, p. 9 – 16, 2009.
- ARIES, R.; French Patent 2186245. *Chem. Abstr.* 81 , 140869, 1974.
- ARIES, R., French Patent 2190431. *Chem. Abstr.* 84, 35329, 1976.
- AUFDERHEIDE, A.C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci* v.101, p. 2034-2039, 2004.
- BABAOGLU, K. et al. Novel inhibitors of an emerging target in *Mycobacterium tuberculosis*; substituted thiazolidinones as inhibitors of dTDP-rhamnose synthesis. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. v.13, p. 3227-3230, 2003.
- BERN, C. et al. Evaluation and treatment of Chagas Disease in the United States. *Journal of the American Medical Association*. v.298, p. 2171 – 2181, 2007.
- BONDE, C.G.; GAIKWAD, N.J. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. v.12, p. 2151-2161, 2004.
- BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A.A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.42, p. 948-954, 2007.

- BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A.A. Synthetic Communications An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry. *Synthetic Communications*. v.36, p. 1601-1612, 2006.
- BOREA, P.A.; BERTOLASI, V.; GILLI, G. Crystallographic and conformational studies on histamine H1-receptor antagonists. IV. On the stereochemical vector of antihistaminic activity. *Arzneimittel-Forschung*. v.36, p. 895, 1986.
- BOYCE R. J.; MULQUEEN G. C.; PATTENDEN G. Total synthesis of thiagazole, a novel inhibitor of HIV-1 from *polyangium sp.* *Tetrahedron Letters*. v. 35, p. 5705 – 5708, 1994.
- BRAGA, M.V.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Effects of squalene synthase inhibitorson the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 24, p. 72–78, 2004.
- BRASIL - SINAN/SNVS/MS. (Sistema de Notificação de Agravos de Notificação/Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde). Doença de Chagas Aguda: *Manual prático de Subsídios à Notificação Obrigatória no SINAN*. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil. 2004.
- BRASIL - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, p. 1 – 29, 2005.
- BRATTAIN M.G. et al. Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma. *Cancer Research*.v. 41, p. 1751-1756, 1981.
- BRENER, Z.Terapêutica experimental da Doença de Chagas. In JR Cançado, *Doença de Chagas*. Belo Horizonte , Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 510 – 516, 1968.
- BRENER, Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *Pan American Health Organization*. v. 347, p. 2-11, 1997.

- BRITTO, C.C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 122 – 135, 2009
- BRODY, G.; ELWARD, T.E. J. Parasitol. v. 57, p. 108, 1971.
- BURSCH, W. The autophagosomal–lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*. v.8, p. 569–581, 2001.
- CANÇADO, J.R. Tratamento da Doença de Chagas. In J.R. Cançado, *Doença de Chagas*, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, 517 – 540. 1968.
- CAVALLERI, B. et al. 1-Methyl-2-nitroimidazol-5-yl derivatives. IIIrd communication. *Arzneimittel-Forschung*. v. 27, p. 1131-1134, 1977.
- CHAGAS, C. Nova Tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHAUDHARY M. et al. CNS depressant activity of pyrimidylthiazolidones and their selective inhibition of NAD-dependent pyruvate oxidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.64, p. 443-446, 1976.
- CHAUDHARY S.K. et al. Substituted thiazolidones: Selective inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent oxidations and evaluation of their CNS activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 64, p. 614-617, 1975.
- COURA, J.R.; SILVA, J.R. Aspectos atuais do tratamento da Doença de Chagas. *Revista Brasileira de Medicina*. v. 51, p. 283 – 290, 1961.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 97, p. 3 – 24, 2002.

COURA, J.R. Chagas Disease: what is known and what is needed – a background article. v. 102, p. 113 – 122, 2007.

COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas Disease – 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.104, p. 31 – 40, 2009.

CRAIK, C.S. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas Disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 263 – 269, 2009.

CUNHA-E-SILVA, N.L. et al. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 214, p. 7–12, 2002.

CUZZOCREA, S. et al. Antiinflammatory Effects of Mercaptoethylguanidine, a Combined Inhibitor of Nitric Oxide Synthase and Peroxynitrite Scavenger, in Carrageenan-induced Models of Inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 24, p. 450-459, 1998.

DANDIA, A. et al. Efficient microwave enhanced regioselective synthesis of a series of benzimidazolyl/triazolyl spiro [indole-thiazolidinones] as potent antifungal agents and crystal structure of spiro[3H-indole-3,2'-thiazolidine]-3'(1,2,4-triazol-3-yl)-2,4'(1H)-dione. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v.14, p. 2409-2417, 2006.

DANILA, G.; RADU, C. Derivatives of 2-thion-3-isonicotinoylamino-thiazolid-4-one with tuberculostatic activity. *Rev. Med.-Chir*. v. 82, p. 127- 130, 1978.

DE CASTRO, S.L. The Challenge of Chagas Disease Chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. v. 53, p. 83 – 98, 1993.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research*. v. 88, p. 1013 – 1025, 2002.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 89 – 100, 2009.

DE SOUZA, W.; MEYER, H. On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *Journal of Protozoology*. v. 21, p. 48-52, 1974.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; SILVA-FILHO, N.L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. v. 44, p. 67-124, 2009.

DEXTER, D.L.; BARBOSA, J.A.; CALABRESI, P. N,N-Dimethylformamide-induced Alteration of Cell Culture Characteristics and Loss of Tumorigenicity in Cultured Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Research*. v.39, p. 1020-1025, 1979.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia. In JCP Dias, JR Coura (Eds), *Clínica e terapêutica da Doença de Chagas*, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 33 – 66, 1997.

DIAS, J.C.P.; MACÊDO, V.O. Doença de Chagas. In: Coura JR. *Dinâmicas das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2005.

DIAS, J.C.P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of the transfusional Chagas Disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 102, p. 11- 18, 2007.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. *Química Nova*, v. 32, p. 2444 - 2457.

DIAZ DE TORANZO, E.G. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. v. 44, p. 880-881, 1988.

DIROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 23, p. 297-298, 1971.

DIURNO, M.V. et al. Synthesis and structure-activity relationships of 2-(substituted phenyl)-3-[3-(N,N-dimethylamino)propyl]-1,3-thiazolidin-4-ones acting as H1-histamine antagonists. *Farmaco*. v. 54, p. 579-583, 1999.

DIURNO, M.V. et al. Synthesis and antihistaminic activity of some thiazolidin-4-ones. *Journal Medicinal Chemistry*. v. 35, p. 2910-2912, 1992.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative [capturado em 19/09/09]
(http://www.dndi.org.br/Portugues/doenca_chagas.aspx)

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Review Infectious Diseases*. v. 6, p. 223-238, 1984.

DOCAMPO, R. et al. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical. Pharmacology*. v. 30, p. 1947-1951, 1981.

DUBOIS, R.N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. v. 12, p. 1063-1073, 1998.

DWIVEDI, C.; GUPTA, S.S.; PARMAR, S.S. Substituted thiazolidones as anticonvulsants. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 15, p. 553-554, 1972.

EDWARD, H.F.; BRUCE C.C. Comparative In Vitro Activities of Lysostaphin and Other Antistaphylococcal Antibiotics on Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*. v. 13, p. 212-215, 1965

ELIAS, M.C. et al. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol* v. 112, p. 79-90, 2001.

EMMET, J.C. et al. Potential histamine H2-receptor antagonists. 4. Benzyhistamines. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 25, p. 1168-1174, 1982.

EMPERAIRE, L.; ROMAÑA, C.A. Triatominae et Cactaceae: un risque pour la transmission de la trypanosomose Americaine dans le peridomicile (Nord-Est du Bresil). *Parasite*. v. 13, p. 171-178, 2006.

ERGENC, N. et al. Synthesis and hypnotic activity of new 4-thiazolidinone and 2-thioxo-4,5-imidazolidinedione derivatives. *Archiv der Pharmazie*. v. 332, p. 343 – 347, 1999.

FERREIRA, L.F. et al. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Tropica*. v. 75, p. 79-84, 2000.

FIOCRUZ – Portal da Doença de Chagas [capturado em 19/09/09]
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=70>)

FIOCRUZ-AZAMBUJA – Portal da Doença de Chagas [capturado em 19/09/09]
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11>)

FIOCRUZ-DE SOUZA – Portal da Doença de Chagas [capturado em 19/09/09]
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11>)

FIOCRUZ-RODRIGUES – Portal da Doença de Chagas [capturado em 14/12/09]
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=127>)

FIOCRUZ-SOARES e SANTOS – Portal da Doença de Chagas [capturado em 15/12/09]
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124>)

FIOCRUZ-TÉCIA – Portal da Doença de Chagas [capturado em 19/09/09]
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>)

FOGH, J.; TREMPER, G. J. In Fogh, Human Tumor Cells in Vitro, *Plenum Press*, New York, p. 115-119, 1975.

FORNACIARI, G. et al. Chagas' disease in a Peruvian Inca mummy. *Lancet*. v. 339, p. 128-129, 1992.
French Patent, 1604530 - 1972, Chem. Abstr. 79 (1973) 32038.

French Patent, 2198734 - 1974; Chem. Abstr. 82 (1975) 93358.

FU, J.Y. et al. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*. v. 265, p. 16737-16740, 1990.

FUJIKAWA, F. et al. Studies on chemotherapeutics for Mycobacterium tuberculosis. XXII. Synthesis and antibacterial activity on Mycobacterium tuberculosis of N2-(2-pyridyl)-3-P-ethoxyphenylpseudothiohydantoin and N2-(2-benzothiazolyl)-3-allylpseudothiohydantoin derivatives. *Yakugaku Zasshi*. v. 89, p. 1099- 1103, 1969.

GIRAUDON, R. French Patent, 2,108,834, 1972; Chem. Abstr. 79 (1973) 32040.

GUDUDURU, V. Synthesis and antiproliferative activity of 2-aryl-4-oxo-thiazolidin-3-yl-amides for prostate cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 14, p. 5289-5293, 2004.

GUHL, F. Chagas disease and human migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 95, p. 553-555, 2000.

GUHL, F. et al. Isolation of *T. cruzi* DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *American Journal of Physical Anthropology*. v.108, p. 401-407, 1999.

GUHL, F, et al. *T. cruzi* DNA in human mummies. *Lancet*. v.349, p. 1370, 1997

HARGRAVE, K,D.; HESS, F. K.; OLIVER, J. T. N-(4-Substituted-thiazolyl)oxamic acid derivatives, new series of potent, orally active antiallergy agents. *J. Med. Chem*. v. 26, p. 1158-1163, 1983.

HIS, L.C.; BAEK, S.J.; ELING, T.E. Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, v. 256, p. 563-570, 2000.

IUPAC, 2009 – Recomendações da IUPAC 1998 [capturado em 14/12/09]

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#m1>)

JENDROSSEK, V.; HANDRICK, R. Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. *Current Medicinal Chemistry - Anticancer Agents*. v. 3, p. 343–353. 2003.

KAPUSTAYAK, S.M.; NAUK, Z.B.; PRATS, L'VIVS'K. *Med. Inst.* v. 24, p. 78, 1963.

KATTI, S.B. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-thiazolidinone derivatives as potential antimycobacterial agents. *ARKIVOC ii*. p. 120-130, 2005.

KAVITHA, C.V. et al. Synthesis of new bioactive venlafaxine analogs: Novel thiazolidin-4-ones as antimicrobials. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 14, p. 2290-2299, 2006.

Keisen CM, et al 1976. The structure of kinetoplast DNA. I- The mini-circles of *Crithidia lucilae* are heterogeneous in base sequence. *Eur J Biochem* 64: 144 - 151

KOLOMOITSEV, L.R. et al. Effect of 3-phenyl-thiazolidine-dion-2,4-derivatives on some mycobacteria. *Mikrobiolohichnyl Zhurnal*. v. 32, p. 518-520, 1970.

KUMAR, R.; GUPTA, T.K.; PARMAR, S.S. *J. Prakt. Chem.* 312 (1970) 201.

LAZARDI, K.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 34, p. 2097–2105, 1990.

LITVINCHUK, M.D. Pharmacological evaluation of new antitubercular agents. *Farmakologiya i Toksikologiya*. v. 26, p. 725-729, 1963.

LOCKSHIN, A.R.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 36, p. 2405 – 2419, 2004.

LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*. v. 1, p. 495 – 502, 2002.

MANDLIK, J.V.; PATWARDHAN, V.A.; NARGUND, K.S. *J. Univ. Poona. Sci. Technol.* 32 (1966) 43; Chem. Abstr. 68 (1968) 87228.

MARIN-NETO, J.A. et al. The BENEFIT Trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 319 – 324, 2009.

MARR, J.J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 118, p. 111 – 119, 1991.

MASON, R. P.; HOLTZMAN, J. L. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 67, p. 1267-1274, 1975.

TEMPERTON, N. J. et al. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 96, p. 167-176, 1998.

MAYA, J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochemical Pharmacology*. v. 65, p. 999-1006, 2003.

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*. v. 146, p. 601-620, 2007.

McGUIRE, W.C.; O'NEIL, R.C.; BRODY, G. *J. Paracytol.* v. 52, p. 528, 1966.

MERCOSUR 1991. Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR, *Resolución 04-3-CS*, Brasília, Junio 1991.

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

MISRA, N.C.; PATNAYAK, K.K. *Indian Journal Applied Chemistry*. v. 34, p. 148, 1971.

MOHAN, L. et al. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 10, p. 37, 1972.

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*. v. 104, p. 17 – 30, 2009.

MORENO, S. N. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 218, p. 585-591, 1982.

MOUSSERON M.J., U.S. Patent 3678041 - 1972; Chem. Abstr. 77 (1972)114388.

NAGAR, S. et al. Some anticonvulsant and cardiovascular effects of substituted thiazolidones. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.16, p. 178-180, 1973.

NARUTO, S.; MOTOC, I.; MARSHALL, G.R. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 20, p. 529, 1985.

NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line supplement, *J. Cell Biochem. Suppl.* 24 (1996).

OLIVEIRA – JÚNIOR, W. All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI century. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 181 – 186, 2009.

OPS/MSF. Consulta Técnica Regional OPS/MSF sobre Organização e Estrutura da Atenção Médica do Doente e Infectado por *Trypanosoma cruzi*/Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38,p. 538-541, 2005

OTTANA, R. et al. In vitro antiproliferative activity against human colon cancer cell lines of representative 4-thiazolidinones. Part I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. v. 15, p. 3930-3933, 2005.

OTTANA, R. et al. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v. 13, p. 4243-4252, 2005.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION 2007. XVI Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa del Cono Sur, Brasilia, Junio de 2007. Available from: www.paho.org.

PARMAR, S.S. et al. Substituted thiazolidones and their selective inhibition of nicotinamide-adenine dinucleotide dependent oxidations. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 15, p. 99-101, 1972.

PARODI, C.; PADILHA, A.M.; BASOMBRI, M.A. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 288 – 294, 2009.

PARSONS JR., R. L.; HEATHCOCK C. H. Revision of the stereostructure of mirabazole C. *Tetrahedron Letters*. v. 35, p. 1379, 1994.

PEDIATRIAL TROPICAL – [capturado em 12/03/2010]
<http://www.pediatritropical.com/protozoarios%20tisulares.htm>

PREVITERA, T. et al. 3,3'-Di(1,3-thiazolidine-4-one) system. V. Synthesis and pharmacological properties of 3,3'-(1,2-ethanediyl)bis-(2-heteroaryl-1,3-thiazolidine-4-one) derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 25, p. 569-579, 1990.

PYO, H. et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research*. v. 7, p. 2998-3005, 2001.

RAWAL, R.K. et al. 2-(Aryl)-3-furan-2-ylmethyl-thiazolidin-4-ones as selective HIV-RT inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 13, p. 6771-6776, 2005.

REY, L. Parasitologia. 3ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2001.

ROCHA, M.O.C.; NUNES, M.C.P.; RIBEIRO, A.L. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 159 – 166, 2009.

ROMANHA, A. J. et al. Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon- γ in Mediating Parasitologic Cure. *Journal of Infectious Diseases*. v. 186, p. 823-828, 2002.

ROTHHAMMER, F. et al. Chagas disease in pre-Columbian South America. *American Journal of Physical Anthropology*. v. 68, p. 495-498, 1985.

SAEED, A. et al. Synthesis and antifungal activity of some novel N-(4-Phenyl-3-arylthiazol-2(3H)-ylidene) substituted benzamides. *Turkish Journal of Chemistry*. v. 32, p. 1 – 8, 2008.

SANTA-RITA, R.M. et al. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *(Kinetoplastida: Trypanosomatidae)*: cellular and ultrastructural analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 55, p. 780–784, 2005.

SANTOS, A.L.S. et al. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *International Journal for Parasitology*. v. 36, p. 47–56, 2006.

SARAF, S.K.; VERMA, A. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 43, p. 897 – 905, 2008.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 246 – 251, 2009.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas Disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 102, p. 75 – 85, 2007.

SHAPIRO, A.T.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review Microbiology*. v. 49, p. 117 – 143, 1995.

SHARMA, S.C. Synthesis of new fungicides. 2-(4'-Arylthiazolyl-2'-imino)-3-aryl-4-thiazolidones. *Bulletin of the Chemistry Society of Japan*. v.40, p. 2422-2424, 1967.

SHUREIQI, I. et al. 15-Lipoxygenase-1 Mediates Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-induced Apoptosis Independently of Cyclooxygenase-2 in Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. v. 60, p. 6846-6850, 2000.

SHYAM R., TIWARI R.C., Bull. Chem. Soc. Jpn. 49 (1972) 171.

SINGH, P. et al. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 57, p. 162, 1994.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. O *Trypanosoma cruzi*. In: SIQUEIRA BATISTA, R. ; et al. *Moléstia de Chagas*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1996.

SIQUEIRA-BATISTA, R. *Trypanosoma rangeli*. *Revista Brasileira de Medecina*. v. 55, p. 423 – 426, 1998.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P. Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: revisitando o mal de Chagas. *Jornal Brasileiro de Medicina*. v. 82, p. 28 – 41, 2002.

SIQUEIRA-BATISTA, R. *Moléstia de Chagas* 2 ed. – Rio de Janeiro: *Editora Rubio*. 2007.

SOARES, M.J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 94, p. 139–141, 1999.

- SOEIRO, M.N. et al. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 301 – 310, 2009.
- SOLARI, A.J. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell*. v. 19, p. 65-84, 1995.
- SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D.E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* v. 97, p. 14376–14381, 2000.
- SRIVASTAVA, S.L. *Indian Journal Applied Chemistry*. v. 32, p. 369, 1969.
- MOMBER, A.W. et al. Effects of CP-060S, a Novel Cardioprotective Drug, on Cardiac Function and Myocardial Oxygen Consumption - a new cytoprotective principle . *General Pharmacology*. v. 32, p. (57-63, 1999.
- TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. São Paulo; *Atheneu*. 2006.
- TOMPKINS, W.A. et al. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *Journal of the National Cancer Institute*. v. 52, p. 1101-1110, 1974.
- TSUJI, K.; ISHIKAWA, H. Synthesis and anti-pseudomonal activity of new 2-isocephems with a dihydroxypyridone moiety at C-7. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 4, p. 1601-1606, 1994.
- TURKEVICH, N.M. et al. *Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal*. v. 64, 1970; Chem. Abstr. 76 (1972) 34154.
- TURRENS, J. F. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitology*. v. 19, p. 495-501, 2003.
- VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J*. v. 1, p. 89-96, 1987.

VICINI, P. et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorgani & Medicinal Chemistry*. v. 14, p. 3859-3864, 2006.

VIVAS, J.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by D24(25)-sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 7, p. 235–240, 1996.

WALCZYNSKI, K. et al. Histamine H1 receptor ligands: part II. Synthesis and in vitro pharmacology of 2-[2-(phenylamino)thiazol-4-yl]ethanamine and 2-(2-benzhydrylthiazol-4-yl)ethanamine derivatives. *Farmaco*. v. 55, p. 569-574, 2000.

WALCZYNSKI, K. et al. Histamine H1 receptor ligands. Part I. Novel thiazol-4-ylethanamine derivatives: synthesis and in vitro pharmacology. *Farmaco*. v. 54, p. 533-541, 1999.

WESLEI, R.D.; SIMPSON, L. Studies in Kinetoplast DNA. III – kinect complexing of kinetoplast and nuclear DNA from *Leishmania tarentolae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 319, p. 267 – 280, 1973.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: elimination of transmission in Uruguay. *Wkly Epidemiol Rec*. v. 6, p. 38-40, 1994.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: interruption of transmission in Chile. *Wkly Epidemiol Rec*. v. 3, p. 13-16, 1995.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: progress towards elimination of transmission in Argentina. *Wkly Epidemiol Rec*. v. 2, p. 12-15, 1996.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: interruption of transmission in Brazil. *Wkly Epidemiol Rec*. v. 72, p. 1-5, 1997.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: interruption of transmission in Uruguay. *Wkly Epidemiol Rec*. v. 73, p. 1-4, 1998a.

WHO - World Health Organization. 51st World Health Assembly, Resolution WHA51.14. 1998b.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: interruption of transmission in Chile. *Wkly Epidemiol Rec.* v. 2, p. 9-11, 1999.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: certification of interruption of transmission in Chile. *Wkly Epidemiol Rec.* v. 2, p. 10-12, 2000a.

WHO - World Health Organization. Chagas disease: interruption of transmission in Brazil. *Wkly Epidemiol Rec.* v. 19, p. 153-155, 2000b.

WHO, Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. Geneva, 2002.

WHO/TDR - World Health Organization. Report of the Scientific Working Group on Chagas disease, Buenos Aires, Geneva, p. 7, 2006.

WHO, 2009 – Doenças Negligenciadas [capturado em 19/09/09]
(http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html)

ZUBENKY, V.G. et al. Synthesis and tuberculostatic activity of azolidines. *Farmatservtychnyl Zhurnal.* v. 29, p. 78-82, 1974.

ANEXO I: NORMAS DA REVISTAS

International Journal for Parasitology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS (see also <http://www.elsevier.com/locate/ijpara>)

Submission: All papers should be submitted on-line via: <http://ees.elsevier.com/ijpara>

General enquiries prior to submission should be directed to the Editorial Office: editor@IJP.org.au

Prior to submitting a paper it is best to prepare information and a set of files for submission. These files together with preferred file types are listed below. The final pdf should be no larger than 5 mb. Formatting and style issues are listed further below:

Required Information:

- Name, affiliation, email, telephone and fax numbers and mail address information for one corresponding author. This must be the same person nominated as corresponding author on the manuscript title page and this person must submit the manuscript on-line.
- Name and affiliations of all other authors.
- The type of paper you are submitting (Research paper or Rapid Communication).
- **(Note: Current Opinions and Invited Reviews are by invitation only)**

Files: Submission files should be arranged in the following order prior to pdf conversion by the system.

Author agreement (optional at submission, mandatory with or before revision).

Cover letter is mandatory for all submissions and should address the novelty, significance and implications of the work.

Graphical abstract: Authors should supply a thumbnail image for all types of manuscripts. Articles accepted for publication will be featured via a copy of the article abstract together with a thumbnail image to direct people to the manuscript. An image that serves to illustrate the theme of the paper is desired. It can be a figure from the paper or a related image that typifies the content of the paper. Authors must supply the thumbnail image separately as an electronic file. The maximum final dimensions of the thumbnail image will be 5 cm x 5 cm. Please consider readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself.

Manuscript containing (in order) Title, Authors and addresses, Corresponding Author and address, Abstract, Keywords. In numbered sections: 1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results; 4. Discussion; then Acknowledgements; References; Legends to Figures.

Tables with their legends (in separate or combined files, numbered, in order).

Figures (in separate files); preferred formats: JPEG, EPS or PDF.

Supplementary and multimedia files.

For the text: The preferred text format is Microsoft Word. The title page, abstract and text should be formatted with line numbers. In Word, go to file/page setup/layout/line numbers. Click on 'add line numbering', then click on 'continuous' then 'OK' and 'OK' again. The manuscript should be formatted to A4 size paper, in English, double spaced and with 2 cm margins.

Author agreements: The electronic submission should be followed by a letter including the manuscript title, author names, a statement confirming that each author has read the manuscript and accepts responsibility for its contents, a statement of financial or other relationship that might lead to a conflict of interests, together with the signatures of all authors. This letter should be faxed or e-mailed to:

Editor-in-Chief, International Journal for Parasitology

Fax: +61 (0) 3 5256 1396; E-mail: editor@IJP.org.au

During submission you will also have to agree to an "Ethics in Publishing" document.

General. The journal publishes the results of high quality original research in all aspects of basic and applied parasitology, ranging from parasites and host-parasite relationships of intrinsic biological interest to those of social and economic importance in human and veterinary medicine and agriculture. Original research includes the development of new concepts and techniques, as well as experimental and observational science. Because of its breadth of discipline coverage, the aims and significance of all contributions should be made clear to readers who are not expert in the particular subject of papers. In applied parasitology, it will tend to favour contributions of broader significance to the subject rather than narrow, highly specialised applications. Submitted manuscripts are first reviewed by a specialist editor to assess significance and general suitability for the journal. Approximately half of all submissions progress to peer review.

There are no page or submission charges. Twenty-five free reprints will be provided.

There are two types of papers, structured as follows:

Original Research Papers

Title page. Contains the title, authors' names, addresses, name and contact details of the corresponding author.

Abstract. The second page contains an Abstract of not more than 300 words in a single paragraph. At the foot of this page a list of up to 8 Index Keywords should be provided.

Text. (see sections above) In addition to major headings two forms of subheadings are used: (a) the numbered italicised side subheading referring to several paragraphs; (b) the italicised paragraph subheading at the beginning of a single paragraph used only in Materials and methods.

Rapid Communications

The journal offers particularly rapid publication of highly significant findings. The covering letter must contain an explanation as to why the work is of such significance to justify publication as a Rapid Communication. Authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief prior to submission to see if their paper merits rapid publication and the final decision on acceptance will be influenced not only by scientific assessment but also by considerations of priority and suitability for this section of the Journal. Articles will be limited to 4,000 words and not more than four display items (figures or tables). The article must not be preliminary but will describe significant and substantial new findings, be complete in itself and not be published at a later date in greater detail. The typescript should be marked "**RAPID COMMUNICATION**" on the top left-hand corner of the title page. The first page should show title, author and address details. A short Abstract of not more than 100 words in the same style as for full papers plus up to six Keywords should follow. The text of the paper is next, written with a minimum number of paragraphs and no headings. Not more than 20 essential references should be given. Other instructions are the same as those for full papers.

Acknowledgements. Authors should provide confirmation of consent from persons acknowledged in manuscripts eg. personal communications. This can be provided in a covering letter or by e-mail to the editorial office.

References. Correct references are the responsibility of the author. Please ensure that all references cited in the text are included in the reference list. References in the text start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g. 'Combes (2001) has shown the importance of ...', or '... has been described (Combes, 2001; Kumar et al., 2004) ...', using date order. More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by two authors, use (Sangster and Dobson, 2002) or for more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. There is an output style available for EndNote. Please refer to the EndNote website or contact the Editorial Office for a copy of this style file. The references in the reference list should be in alphabetical order. References to journal articles should contain names and initials of all author(s), year of publication, article title, abbreviation of the name of the journal according to the *List of Serial Title Word Abbreviations* (International Serials Data System, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8), volume number and page numbers. Unpublished data, personal communications and papers "in preparation" or "submitted", abstracts (whether published or not)

and theses should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work "in press" may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter or e-mail from the named person(s) giving permission to quote such information. References to books should also include the title (of series and volume), initials and names of the editor(s) and publisher and place of publication.

Examples:

Combes, C., 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. University of Chicago Press, Chicago and London.

Kumar, N., Cha, G., Pineda, F., Maciel, J., Haddad, D., Bhattacharyya, M.K., Nagayasu, E., 2004. Molecular complexity of sexual development and gene regulation in *Plasmodium falciparum*. Int. J. Parasitol. 34, 1451-1458.

Pettersson, E.U., Ljunggren, E.L., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., in press. Functional analysis and localisation of a delta-class glutathione S-transferase from *Sarcoptes scabiei*. Int. J. Parasitol.

Sangster, N.C., Dobson, R.J., 2002. Anthelmintic resistance. In: Lee, D.L. (Ed.), The biology of nematodes. Taylor and Francis, London and New York, pp. 531-567.

Tables. These should be self-explanatory, each on a separate page with its title at the top, numbered consecutively. There should be no vertical lines in tables. Abbreviations if used at all, should be explained as footnotes identified by small superscript alphabetical characters.

Abbreviations. Avoid the use of abbreviations, but if necessary, authors should use the list printed at the end of these Instructions as a guide to those terms that need not be given in full, or define each abbreviation on first use.

Figures. Illustrations of all kinds should be listed together under "Legend to Figures" numbered consecutively and their positions indicated in the text. Figures should be high quality, of an adequate size to ensure clarity, and letters and numbers should be at least 4 mm in height. Magnification should be indicated by inclusion of a scale bar in the figure and its value should be indicated on the figure or in the legend. Each figure should be obvious from its file name. If images have been altered, describe the nature of changes made and software used. This information should be included in the 'Materials and methods' section of the manuscript. In general, figures will be printed and appear on electronic versions of papers in black and white. Where appropriate, colour figures can be provided on the electronic version, but black and white in the printed version. Authors should note that the figure legend will be the same in both versions. While there is no charge for colour in electronic versions, there generally is a fee for printed colour figures. Please contact the Editorial Office for the current policy.

Supplementary files. For non-integrated supplementary files, a footnote should be typed on the title page of the manuscript: "Note: Supplementary data associated with this article". A copy of supplementary material should be submitted at the same time as the manuscript. Preferred formats are Microsoft Office for text or graphics and avi for movie files. Maximum size of files is 10 MB. Files too large to submit online should be sent to the journal office on CD.

Submission of sequence data to databases. Novel nucleotide or protein sequence data must be deposited in the GenBank™, EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript: 'Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by the World Wide Web to either GenBank (via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>), EMBL (via WebIn: <http://www.ebi.ac.uk/subs/allsubs.html>) or to DDBJ (via SAKURA: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>). Special types of submissions, such as genomes, bulk submissions, segmented sets, and population/phylogenetic/mutation studies, can be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

GenBank/DNA sequence linking. In order for automatic links to be made between papers and GenBank, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See the example). When published they will appear in normal type.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**". Additionally, any multiple alignments of nucleotide or protein data must be submitted to a recognised database and must also receive a unique accession number. The accession number can appear in

the text in the relevant section of the Results, as: 'Alignment files are available by anonymous FTP from FTP.EBI.AC.UK in directory/pub/databases/embl/align or via the EMBLALIGN database via SRS at <http://srs.ebi.ac.uk> ; under accession(s)'. The usual method for submitting alignments is by the World Wide Web to the European Bioinformatics Institute (via Webin-Align: <http://www.ebi.ac.uk>). Microarray data, in MIAME-compliant format, should be submitted to ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Accession identifiers relating to the data should be provided in the manuscript text.

Policy on bioinformatics papers. In silico analysis: The following guidelines apply to papers that exclusively use in silico analysis or rely heavily on this approach for analysis and conclusions. Such papers should address a significant biological issue or issues. Bioinformatic data should be supported by novel or published biological data. Work would typically use information from a number of databases and even from a number of parasite or host species and use a number of analytical methods. Types of "metaanalysis" are encouraged either across a wide range of parasites or, say, at a number of points in a metabolic or signalling pathway or an immune cascade. In silico analysis may be especially suitable for review articles.

Taxonomic publications. Taxonomic papers should be of broad interest, going beyond purely morphological descriptions which are best suited to specialist journals. Examples of contributions of broader interest include description of new taxa which do not fit within accepted classifications, analyses which are of phylogenetic or biogeographic significance employing a range of analysis techniques or which include information on host-parasite relationships or deleterious effects on the host. Presentations which include description of new species should conform to a prescribed pattern as follows: where the new species name is written for the first time, "n.sp." should succeed it. The name should be followed by: (1) a description, in telegraphic style, i.e. without articles and verbs, of the specific characters; accompanied by illustrations depicting the main differentiating characters; (2) a diagnosis, emphasising the characters of the new species or genus; (3) the details of type material, (host, location in host, geographic locality, collector, place of deposition and registration). Synopses (a brief summary of a small taxonomic group of parasites) and checklists (a list of parasites from particular hosts in particular localities) are acceptable, provided species named are critically evaluated and identifications are sound. Specimens upon which new host or locality records are based must be deposited in a museum or recognised collection to be available for further study and registration numbers must be cited. Names, authors and years of publication of original descriptions of named species should be cited in the text in the manner recommended by the International Code of Zoological Nomenclature.

Care of experimental animals. It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

Statistical analysis. Authors should seek advice on data analysis prior to submission. A commentary (Morrison, D.A., 2002. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *Int. J. Parasitol.* 32, 1065-1070) may also be consulted. Papers may be sent to referees with particular expertise in statistics and modelling.

The review process. The corresponding author, through the web access, is responsible for actions with respect to each paper. E-mail prompts will be delivered only to the corresponding author. Articles can also be tracked by the corresponding author via the online system.

Proofs. Page proofs for correction will be e-mailed to the corresponding author in pdf format by the Publisher. **It is the responsibility of the author to ensure that the proof contains no errors and any corrections are returned to the Publisher within 48 hours of receipt. Only one set of changes will be made to a proof.** Authors should not correct changes that may have been made by the Editor-in-Chief or the Publisher to conform with required presentation, but may refer to them in an accompanying letter to the Production Editor. Proofs, copyright transfers and order for reprints should be returned to:

Elsevier Ireland Ltd, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland
Tel.: +353-61-709600; fax: +353-61-709100

Author Enquiries. For enquiries relating to the submission of articles please visit the Author Gateway from Elsevier at <http://authors.elsevier.com> .

STANDARD ABBREVIATIONS (These terms need not be given in full)

acquired immunodeficiency syndrome - AIDS
adenosine diphosphate - ADP
adenosine monophosphate - AMP
analysis of variance - ANOVA
ampere A
adenosine 5'-triphosphate - ATP
aqueous aq

base pair bp
becquerel Bq
bovine serum albumin BSA

central nervous system CNS
cerebrospinal fluid CSF
chi-squared (statistics) χ^2
coulomb C
counts min⁻¹, counts s⁻¹ c.p.m, c.p.s.
cyclic 3',5'-adenosine monophosphate - cAMP
cyclic guanosine monophosphate - cGMP

dalton (use for molecular mass) Da
deoxyribonucleic acid DNA
copy cDNA
recombinant recDNA
deoxyribonucleotide triphosphate - dNTP
deoxyuridine triphosphate - dUTP
4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI
dimethyl sulfoxide - DMSO
dithiothreitol - DTT
Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM

enzyme-linked immunosorbent assay ELISA
enzyme unit (international) U
ethylenediaminetetra-acetic acid EDTA
ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid - EGTA

fluorescein isothiocyanate - FITC
foetal calf serum FCS
Freund's complete adjuvant FCA

glutathione-S-transferase - GST
gram g
gravitational field (centrifuging) g
green fluorescent protein - GFP
guanosine triphosphate - GTP

haematoxylin and eosin H & E
haemoglobin Hb
hertz Hz
high-performance liquid chromatography HPLC

hour h
human immunodeficiency virus - HIV

immunoglobulins IgA, IgD, IgE, IgG, IgM
indirect immunofluorescence antibody test IFAT
interferon γ IFN γ
interleukin IL (IL1, IL2 etc)
international unit i.u.
intramuscular i.m.
intraperitoneal i.p.
intravenous i.v.
isoelectric point pI
isotopes – [³²P], [³⁵S], etc.

joule J

larval stages (nematodes) L1, L2 etc
liquid chromatography tandem mass spectrometry
– LC/MS-MS
litre L

matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry – MALDI-TOF-MS
mega (prefix) M
metre m
minute (time) min
molar (concentration) M or mol L⁻¹
mole mol
molecular mass (relative) *M_r*
molecular weight mol. wt

N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid - HEPES
nicotinamide adenine dinucleotide - NAD
reduced - NADH
phosphate - NADP
reduced NAD phosphate - NADPH
normal (concentration) N
not significant NS
number of observations (statistics) *n*

optical density O.D.
osmolar OSM or osmol L⁻¹

packed cell volume PCV
parts per million p.p.m.
pascal Pa
phosphate buffered saline PBS
polyacrylamide gel electrophoresis PAGE

polymerase chain reaction PCR
post-infection p.i.
probability (significance level) *P*

radioimmunoassay RIA
relative humidity r.h.
relative mobility (electrophoresis) *M*, *M_x*
ribonucleic acid RNA
messenger mRNA
mitochondrial mtRNA
nuclear nRNA
ribosomal rRNA
small subunit ssrRNA
large subunit lsrRNA
transfer tRNA
Roswell Park Memorial Institute - RPMI

second (time) s
sodium dodecyl sulphate - **PAGE** SDS-PAGE
species (singular/plural) sp. / spp.
standard deviation S.D.
standard error of the mean S.E.M.
Student's *t* (statistics) *t*
subcutaneous s.c.
sum (statistics) "

tumour necrosis factor TNF
ultraviolet u.v.
uridine triphosphate - UTP

volt V
volumes (abbrev after number) vol.
volume per volume v/v
watt W

ANEXO II: COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO

Comprovação da Submissão:

ANEXO III: MATERIAL E MÉTODOS

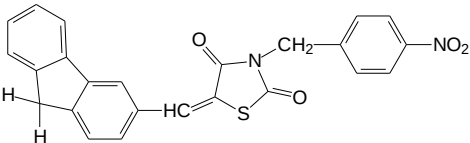
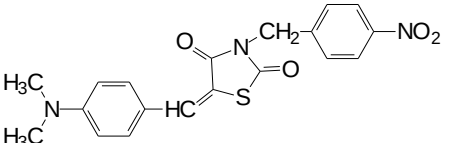
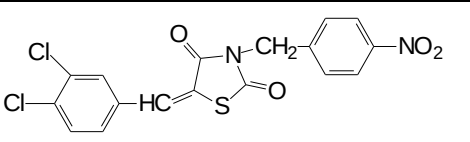
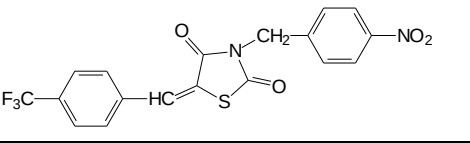
MATERIAL

Tiazolidinadionas

Foram utilizadas 12 novas tiazolidinadionas sintetizadas, devidamente caracterizadas estruturalmente e depositadas na Quimioteca do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco.

Quadro I: Informações químicas dos derivados tiazolidínicos

Código	Estrutura	Nome	Peso Molecular
LPSF-GQ-32		3-Biphenyl-4-ylmethyl-5-(4-nitro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	416,46
LPSF-GQ-77		5-(4-Methanesulfonyl-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione	387,48
LPSF-GQ-98		3-(2-Chloro-6-fluoro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	392,79
LPSF-GQ-109		3-(2,4-Dichloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	409,25
LPSF-GQ-116		3-(2-Bromo-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	419,25
LPSF-SF-17		3-(4-Nitro-benzyl)-5-(3,4,5-trimethoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	430,44
LPSF-SF-22		3-(4-Nitro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	385,36
LPSF-SF-24		5-Benzylidene-3-(4-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione	340,36

LPSF-SF-25		5-(9H-Fluoren-2-ylmethylene)-3-(4-nitrobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione -	428,46
LPSF-SF-27		5-(4-Dimethylamino-benzylidene)-3-(4-nitrobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione	383,42
LPSF-SF-29		5-(3,4-dichloro-benzylidene)-3-(4-nitrobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione	409,24
LPSF-SF-31		3-(4-Nitro-benzyl)-5-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione	408,36

Animal

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos isogênicos BALB/c fornecidos pelo biotério do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Parasita

As cepas Y das formas tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi* foram cedidas pelo Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fiocruz.

Material de consumo

- Tubo Falcon (Tubos de 15mL, Eppendorf do Brasil, São Paulo - Brasil);
- RPMI 1640 (Himedia, Mumbai - Índia);
- Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab; Campinas, São Paulo – Brasil);
- Placa de Petri de vidro;
- Água destilada;
- Azul de Trypan (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro - Brasil);
- Câmara de Neubauer (LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Germany);
- Placas de cultura de 96 poços de fundo plano (TPP, Trasadingen, Switzerland);
- Derivados tiazolidínicos fornecidos pelo Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos (LPSF) – GQ-32; GQ-77; GQ-98; GQ-109; GQ-116; SF-17; SF-22; SF-24; SF-25; SF-27; SF-29; SF-31.

- Timidina Tritiada (Amersham Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo – Brasil);
- Saponina (Sigma Company, St Louis, MO - USA);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro - Brasil);
- Papel de Fibra de vidro;
- Meio para cultura 3N inclinado + meio para cultura BHI (brain heart infusion);
- Garrafas de cultura de 25 cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) ;
- Resina Epon 812 (Sigma Company, St Louis, MO - USA)

Equipamentos

- Câmara de CO₂ (IAM/Fiocruz, Recife, Pernambuco – Brasil);
- Fluxo vertical (Pachane P600, Piracicaba, São Paulo-Brasil);
- Centrífuga (Centrifuge TJ-6 Beckman Coulter, Brea, CA - USA);
- Incubadora de CO₂ a 37°C (HF212UV, Shanghai Lishen Scientific Equipment, Shanghai - China);
- Incubadora B.O.D. (Estufa B.O.D. Eletrolab, São Paulo, São Paulo – Brasil);
- Coletor de Células (Cell Harvest Skatron, Skatron Instruments, Lier - Norway);
- Contador de radiação beta (1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Co. LKB Wallace, Turku - Finlândia);
- Microscópio eletrônico de transmissão fabricado pela FEI, Morgagni 268D (FEI Company , Hillsboro, Oregon – USA);
- Software Prisma 4 Graphpad;

MÉTODOS

Obtenção de Células Esplênicas

Células esplênicas foram obtidas de acordo com Pereira e colaboradores (2004). Após sacrifício do animal em câmara de CO₂ (CPqAM/Fiocruz, Recife, Pernambuco – Brasil), o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon (Tubos de 15mL, Eppendorf do Brasil, São Paulo - Brasil) contendo meio RPMI 1640 (Himedia, Mumbai - Índia) sem Soro Fetal Bovino (SFB) - meio incompleto. No fluxo vertical (Pachane P600, Piracicaba, São Paulo-Brasil), cada baço foi transferido para placa de Petri onde foram macerados. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640

incompleto por baixo, centrifugadas (Centrifuge TJ-6 Beckman Coulter, Brea, CA - USA) a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, ao sedimento adicionou-se água destilada para promover lise das hemácias. O sobrenadante, sem conter os debris celulares, foi coletado e centrifugado a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuspenso em meio RPMI 1640 completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi separada. Em seguida, diluída em azul de trypan (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro - Brasil) para ser quantificada em câmara de Neubauer (LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Germany), assim como verificar a viabilidade celular.

Avaliação da Atividade Tóxica dos Compostos em Células de Camundongos Isogênicos

Células esplênicas (6×10^5 células/poço), obtidas de acordo com item anterior, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano (TPP, Trasadingen, Switzerland), contendo meio de cultura RPMI 1640 completo. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os derivados tiazolidínicos em seis diferentes concentrações (100; 50; 25; 10; 5 e 1 µg/ml) e de timidina tritiada (1 µCi/poço), durante 24 horas em estufa de CO₂, a 37°C (HF212UV, Shanghai Lishen Scientific Equipment, Shanghai - China). Para o controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%), células tratadas com dimetilsulfóxido (DMSO) (1%), e sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 µCi/poço) associada em paralelo. Cada molécula foi testada em triplicata. Após 24 horas de incubação, as células foram coletadas (Cell Harvest Skatron, Skatron Instruments, Lier - Norway) em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação (1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Co. LKB Wallace, Turku - Finlândia). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as moléculas em relação aos poços não tratados.

Cultura de *Trypanosoma cruzi*

As culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y - Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fiocruz) foram crescidas a 28°C (Estufa B.O.D. Eletrolab, São Paulo, São Paulo – Brasil) em meio 3N e expandidas em meio BHI (brain heart infusion). Para avaliar a inibição de crescimento dos parasitas, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram coletadas da cultura no sétimo dia. A avaliação da atividade tripanocida foi realizada, partindo-se de duas lavagens dos parasitas em solução salina tampão de fosfato por centrifugação (1000 vezes a gravidade), à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A contagem dos parasitas foi realizada em câmara de

Neubauer. As culturas da forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y - Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz) foram obtidas do sobrenadante de 5-6 dias de células Vero (Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz) infectadas. Células infectadas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) por 5-6 dias a 37°C em uma estufa a 5% de CO₂. Depois deste período, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 500 x g por 5 minutos permanecendo a 37°C por 30 minutos. Durante este período, os tripomastigotas do sedimento centrifugado foram movidos para dentro do meio com sobrenadante, o qual foi coletado e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. Os tripomastigotas concentrados no sedimento centrifugado foram contados em câmara de Neubauer, e utilizados na concentração de 5x10⁶ células para infectar a camada de células hospedeiras cultivadas em garrafas de cultura (TPP, Trasadingen, Switzerland) de 25 cm². Depois de 24 horas da infecção, o meio de cultura foi trocado para remoção dos parasitos livres, incubando as células hospedeiras a 37°C a 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas durante todo o período do experimento.

Avaliação da atividade dos compostos tiazolidínicos contra *Trypanosoma cruzi*

Para determinar o efeito antiproliferativo para *T. cruzi*, formas epimastigotas (10⁶/ml) crescidos em culturas axênicas, na fase log de crescimento, foram colocadas em placas de 96 poços no volume de 100 µl, sob condições de cultura adequadas (26°C). Formas tripomastigotas adquiridas através do procedimento supracitado foram colocados em placas de 96 poços no volume de 100 µl, sob condições de cultura adequada, 37°C e 5% de CO₂. O crescimento das formas epimastigotas e tripomastigotas foram realizados na ausência e na presença de diferentes concentrações de derivados tiazolidínicos (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,1 µg/mL). Os testes foram conduzidos tendo como controles benzonidazol, nifurtimox e culturas de parasitos sem tratamento. O percentual de atividade contra o parasita foi determinada comparando-se os valores das absorbância dos poços incubados com os compostos e os valores do controle sem tratamento. Após identificação das substâncias ativas, estas foram avaliadas quanto à concentração inibidora de 50% do crescimento dos parasitas (IC50%). Formas epimastigotas da Cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas durante 11 dias, já as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas por 24 horas, ambos na presença das nove diferentes concentrações dos compostos, procedendo-se em seguida a contagem de parasitas viáveis através de câmara de Neubauer. O cálculo da IC50% foi determinada por meio de uma regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

Microscopia Eletrônica

Os fragmentos e formas tripomastigostas incubadas com os compostos tiazolidínicos LPSF-SF29 e LPSF-GQ109 foram lavados duas vezes em PBS e fixados durante duas horas em solução contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (dimetilarsenato de sódio) a 0,1M, pH 7,2. Lavados três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixados, durante uma hora, numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 5mM CaCl₂ e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Novamente, foram lavados no mesmo tampão, contrastados em bloco com acetato de uranila a 2% e desidratados em série crescente de acetona. Para finalizar o processamento as amostras foram infiltradas e emblocadas em resina Epon 812 (Sigma Company, St Louis, MO - USA). O material foi cortado em ultramicrotomo e as grades coradas com citrato de chumbo e acetato de uranila 5% em água. Posteriormente as amostras foram observados em Microscópio eletrônico de transmissão fabricado pela FEI, Morgagni 268D

ANEXO IV: RESUMOS DE CONGRESSOS

Evaluation of the cytotoxicity Thiazolidinediones derivatives.

¹Barbosa, A.F.S.*; ¹Alcântara, S.C.; ¹Oliveira, L.C.L.; ¹Oliveira, A.R.; ²Rocha, L.F.; ²Castro, M.C.A.B.; ²Souza, M.A.; ¹Lima, M.C.A.; ¹Galdino, S.L.; ²Pereira, V.R.A, ¹Pitta, I.R. e-mail:arturfelipes@gmail.com

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – (LPFS), Departamento de Antibióticos,
²Laboratório de Imunoparasitologia – Centro de Pesquisa Ageu Magalhães (CPqAM)

Keywords: Imidazolidines, cytotoxicity and anti-trypanosoma cruzi

Introduction: Acute toxicity testing in animals is typically the initial step in the evaluation of the health effects of a chemical, and its primary purpose is to provide information on potential health hazards that may result from a short-term exposure. Recent studies suggest that in vitro methods might be helpful in predicting acute toxicity and estimating toxic chemical concentrations in vivo¹. Synthetic thiazoline derivatives are useful medicaments showing antifungal, anti-allergic, anti-hypertensive, antiinflammatory, antibacterial, analgesic, anti-rheumatic, anti-pyretic, and anti-HIV13 activities. Some fused thiazolines find applications in the treatment of allergies, hypertension, inflammation, schizophrenia, and bacterial and HIV infections. 2-Thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones show marked antimicrobial activity against bacteria, yeasts, and molds². Thiazolidinediones derivatives will be study as a potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. In this work, we realized the cytotoxicity of the of 3 new thiazolidines derivatives of the series (LPSF/GQ98), (LPSF/SF29) (LPSF/SF31), that were determined using BALB/c mice splenocytes (5x10⁶ cells/well) cultured in 96-well plates. **Results and Discussion:** The compounds synthesized for Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) were: thiazolidine-2,4-dione substituted by nitro, chlorine and fluorine (LPSF/GQ98), nitro and chlorine (LPSF/SF29) or tri-fluorine and nitro (LPSF/SF31). Each compound was dissolved and evaluated for their ability to inhibit splenocytes proliferation in concentration single (25µg/mL). Cell proliferation was determined by adding thymidine per well for 24 h at 37°C and 5% CO₂. After this period, were determined the ³H-thymidine incorporation using a beta-radiation counter. The toxicity of the compounds was compared with the compounds untreated and standard drug. The derivatives were tested on proliferation of spleen cells from BALB/c mice, and showed non-toxic when compared with Bz and NF standard drug against *T. cruzi*. **Conclusion:** The derivates are efficient in the proliferation of spleen cells without affecting the cell viability at the dose assayed.

Resumo enviado ao 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIA DE DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.

Artur FS Barbosa^{1,2}, Fabiana OS Gomes^{1,2}, Lucas F Rocha², Maria CA Lima¹, Suely L Galdino¹,
Valéria RA Pereira², Ivan R Pitta¹

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – UFPE (LPSF/UFPE)

²Laboratório de Imunoparasitologia - CPqAM

INTRODUÇÃO: As políticas de combate à Doença de Chagas apresentam um nível considerável de negligência e está classificada no nível III pelo TDR, onde o foco da pesquisa baseia-se na melhoria e uma disseminação mais ampla de ferramentas existentes e estratégias para seu combate. Descoberta de novas drogas antiparasitárias é de alta importância, contribuindo para uma abertura maior de opções farmacológicas contra esta doença.

OBJETIVOS: Avaliar em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c a atividade citotóxica de moléculas tiazolidínicas e determinar a atividade anti-parasitária *in vitro* das substâncias avaliadas sobre forma tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS: Para citotoxicidade, as células foram incubadas com o fármaco e com timidina tritiada durante 24h em estufa de CO₂ a 37°C. Como controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%) e células sem tratamento, todos com timidina associada em paralelo. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de ³H determinada através do contador beta de cintilação. Formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas durante 24 horas, na presença dos compostos (LPSF/SF31 e LPSF/SF29), procedendo-se em seguida a contagem de parasitas viáveis. Como controles foram utilizados benzonidazol (BNZ) droga com atividade tripanosomicida conhecida e culturas de parasitos sem tratamento. O cálculo da IC_{50%} foi determinada por meio de uma regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

RESULTADOS: No ensaio de citotoxicidade obtivemos valores de 25 µg/mL para os dois compostos bem como para o BNZ, e uma inibição da proliferação de esplenócitos em 26,68% para o LPSF/31 e de 29,20% para o LPSF/29. Na determinação do IC_{50%} os compostos LPSF/SF31 e LPSF/SF29 apresentaram valores de 0,001 e 10,29.

CONCLUSÃO: Os derivados apresentam uma citotoxicidade semelhante ao BNZ, demonstrando que não comprometem a viabilidade celular. O IC_{50%} do LPSF/SF31 foi aproximadamente 10000 vezes menor que o do BNZ, demonstrando potencial ação tripanocida.

Resumo enviado ao XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

EVALUATION CYTOTOXIC AND TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF NEW DERIVATES THIAZOLIDINES

Barbosa, A.F.S.^{1,2}, Gomes, F.O.S.^{1,2}, Rocha, L.F.², Lima, M.C.A.¹, Galdino, S.L.¹, Pereira, V.R.A.², Pitta, I.R.¹

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – UFPE (LPSF/UFPE)

²Laboratório de Imunoparasitologia - CPqAM

INTRODUCTION: Policies to combat Chagas's disease have a considerable degree of negligence and are classified at level III by TDR (Research in Infectious Tropical Diseases), where the research focus is based on the improvement and a wider dissemination of existing tools and strategies for combating the disease. The discovery of new antichagasic drugs is of high importance, contributing to a greater opening of pharmacological options against this disease.

OBJECTIVES: Evaluate the cytotoxic activity of thiazolidines molecules through the culture of splenocytes of BALB/c mice, and determine the anti-parasitic activity *in vitro* of the substances evaluated in the trypomastigotes form of *Trypanosoma cruzi*.

MATERIALS AND METHODS: The cytotoxicity of the compounds was determined using BALB/c mice splenocytes (5x10⁶ cells/well) cultured in 96-well plates in RPMI 164 (Sigma Chemical Co) supplemented with 10% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP) and 50 µg/mL of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO). Each compound was dissolved in DMSO and was evaluated for their ability to inhibit splenocytes proliferation at six different concentrations (1, 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL), in duplicate. Cell proliferation was determined by adding 1 µCi of [³H] – thymidine per well for 24 h at 37°C and 5% CO₂. After this period, the content of the plate was harvested to determine the ³H-thymidine incorporation using a beta-radiation counter (β-matrix 9600, Packard). The toxicity of the compounds was determined comparing the percentage of ³H-thymidine incorporation of drug-treated wells in relation to untreated wells. Non-toxic concentrations were defined as those causing a reduction of ³H-thymidine incorporation below 30% in relation to untreated controls.

Trypomastigote forms of Y strain of *T. cruzi* were grown for 24 hours in the presence of the compounds (LPSF/SF29 and LPSF/GQ116), and after that period the counting of viable parasites was done. As controls were used benznidazole (BNZ), drug with known trypanocidal activity, and cultures of parasites without treatment. The IC₅₀ was determined by a simple linear regression using the software GraphPad Prism 4.

RESULTS: In the test of cytotoxicity values of 10 and 25 µg/mL were obtained for the compounds LPSF/GQ116 and LPSF/SF 29, respectively, and 25 µg/mL for the BNZ, with an inhibition of proliferation of splenocytes in LPSF/GQ116 of 20.76% and 29.20% for LPSF/29. In the IC₅₀ determination of the compounds LPSF/GQ116 and LPSF/SF29 values of 5.33 and 10.29 were obtained.

CONCLUSION: The derivatives have good cytotoxicity when compared to the BNZ, demonstrating that they do not interfere in the cell viability. The IC₅₀ for the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* of the two compounds were very close to the standard drugs, the BNZ, showing a good trypanocidal activity.

Resumo enviado ao Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas

EFEITO DA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO LETAL SOBRE A VIABILIDADE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* – UTILIZANDO O AZUL DE METILENO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR: ESTUDO *IN VITRO*

Barbosa, A.F.S.^{1,2}, Gomes, F.O.S.^{1,2}, Rocha, L.F.², Lima, M.C.A.¹, Galdino, S.L.¹, Pereira, V.R.A.², Pitta, I.R., Pinheiro, A.L.B.³

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – UFPE (LPSF/UFPE)

²Laboratório de Imunoparasitologia – CpqAM

³Centro de Biofotônica da FOUFBA

As políticas de combate à Doença de Chagas apresentam um nível considerável de negligência e está classificada no nível III pelo TDR, onde o foco da pesquisa baseia-se na melhoria e uma disseminação mais ampla de ferramentas existentes e estratégias para seu combate. A Terapia Fotodinâmica (TFD) baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador (FS) ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente. Neste trabalho, buscamos verificar eficácia da fotossensibilização letal associados a um laser semiconductor de InGaAlP, num comprimento de onda (λ) igual a $660\text{nm} \pm 10\text{nm}$, potência óptica de 30 mW, emitindo luz no espectro visível vermelho, com uma dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ em modo contínuo, utilizando o azul de metileno (MB) como FS em concentrações (0,78 – 0,39 – 0,19 – 0,1 – 0,05 e 0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre as formas tripomastigotas infectantes de *Trypanosoma cruzi*. Para se determinar a viabilidade dos parasitos, uma amostra de cada grupo tratado em cada concentração foi retirada e analisada em câmara de Neubauer, observando a diminuição da quantidade de parasitas vivos em relação a solução sem tratamento. Os resultados demonstraram significantes percentuais de lises parasitários (chegando a 86% de letalidade), o que não pode ser observado nos grupos tratados apenas com o laser ou com o FS.

Palavras – Chaves: Fotossensibilização Letal, *Trypanosoma cruzi*, Azul de Metileno

Resumo enviado ao I Congresso Internacional de Laser da Bahia

EFEITOS MORFO-ESTRUTURAIS CAUSADOS POR LASER DIODO 660NM EM FORMAS EPIMASTIGOSTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: ESTUDO *IN VITRO*

Barbosa, A.F.S.^{1,2}, Lima, M.C.A.¹, Galdino, S.L.¹, Pereira, V.R.A.², Pitta, I.R., Pinheiro, A.L.B.³

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – UFPE (LPSF/UFPE)

²Laboratório de Imunoparasitologia – CpqAM

³Centro de Biofotônica da FOUFBA

As doenças parasitárias representam um dos principais problemas de saúde pública na América Latina, em particular a Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* pertencente a ordem *Kinetoplastida*, que infecta mais de 18 milhões de pessoas em todos os países da América Latina. Os lasers utilizados na laserterapia emitem comprimentos de onda tanto na faixa do visível como no infravermelho (laser diodo). A luz visível induz uma reação fotoquímica, que induz a ativação de enzimas principalmente as utilizadas na cadeia respiratória, e essa luz tem como alvos primários os lisossomos e mitocôndrias das células, aumentando principalmente a produção do ATP Mitochondrial. O intuito deste trabalho foi verificar as alterações morfo-estruturais geradas na forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, após a irradiação com a um laser semiconductor de InGaAIP, num comprimento de onda (λ) igual a $660\text{nm} \pm 10\text{nm}$, potência óptica de 40 mW, emitindo luz no espectro visível vermelho, com uma dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ em modo contínuo. Em seguida os parasitas que sofreram a irradiação foram analisados por microscopia óptica e comparados aos sem tratamento. Constatou-se o aumento de tamanho do cinetoplasto (estrutura com elevada concentração de DNA extracelular – kDNA, cuja principal função é de codificar enzimas da cadeia respiratória como a ATPase e citocromoxidase), do núcleo celular e do volume celular do parasito, o deixando mais arredondado.

Palavras-Chaves: Laserterapia, *Trypanosoma cruzi*, enzimas respiratórias

Resumo enviado ao I Congresso Internacional de Laser da Bahia

Dyed and Dead – Phenothiazinium and your Photosensitiser Potential against the Chagas Disease **Artur Felipe Santos Barbosa¹**

¹*Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – UFPE (LPSF/UFPE)*

A doença de Chagas é uma antroponose causada por um protozoário parasita chamado *Trypanosoma cruzi*. É considerada pela Organização Mundial da Saúde um dos principais problemas de saúde do mundo, possuindo cerca de 17 milhões de pessoas infectadas distribuídas principalmente por 18 países endêmicos na América Latina. Por se tratar de uma doença Negligenciada, os investimentos a níveis de diagnóstico, controle e tratamento são muito pequenos. Políticas de incentivo a novas propostas de ferramentas, medicamentos e controle da doença são incentivadas pela OMS. Em resposta a isso novas estratégias de combate ao parasito estão sendo utilizadas como teste com novos fármacos, utilização de medicamentos contra fungos e outras terapias. Neste estudo utilizamos derivados fenotiazínicos que são bastante conhecidos na prática médica e bastante demonstrados na literatura como corantes celulares. Uma nova característica vem sendo estudada nos derivados fenotiazínicos é seu potencial fotossensibilizante. O fotossensibilizador ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando a produção de radicais livres (reação tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio molecular distribuído pelo sistema vascular (reação tipo II), levando a produção de oxigênio singlete, altamente oxidante. Ambos os caminhos podem levar a morte celular e a destruição de tecido doente. Algumas enzimas do *Trypanosoma cruzi* foram identificadas como alvos da ação do fotossensibilizante são elas a superóxido desmutase, Citocromo-c oxidase e Tripanotiona redutase, gerando índices satisfatórios de morte parasitária.

Resumo enviado ao II Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas