

**FABIANA OLIVEIRA DOS SANTOS GOMES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal.

**ORIENTADORA**

Dra. Suely Lins Galdino

**CO-ORIENTADORA**

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

**RECIFE**

**2010**

**Gomes, Fabiana Oliveira dos Santos**

**Avaliação in vitro de derivados 2-tioxo-imidazolidínicos para quimioterapia da doença de chagas / Fabiana oliveira dos Santos Gomes. – Recife: O Autor, 2010.**

**115 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Suely Lins Galdino.**

**Co-Orientador: Valéria Rêgo Alves Pereira.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2010.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Farmacologia 2. Medicamentos - Desenvolvimento 3. Doença de chagas 4. Doença do barbeiro 5. Tripanossomíase americana I. Título.**

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

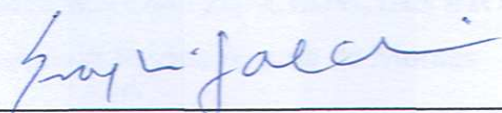
Parecer da comissão examinadora da dissertação de:  
Fabiana Oliveira dos Santos Gomes

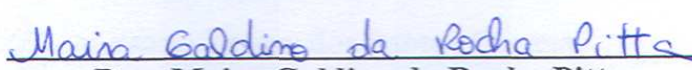
intitulada:

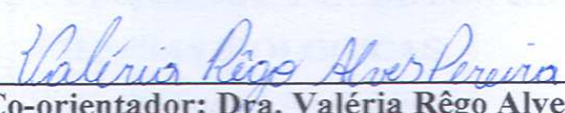
Avaliação *in vitro* de derivados 2-tioxo-imidazolidinicos para quimioterapia da doença  
de chagas

A comissão examinadora considera o presente trabalho  
APROVADO

Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Fabiana Oliveira dos Santos Gomes  
faz jus ao grau de Mestre em Ciências Biológicas pela UFPE. Recife, 25/03/2010.

  
Orientador: Dra. Suely Lins Galdino  
Departamento de Antibióticos, UFPE

  
Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta  
Departamento de Bioquímica, UPFE

  
Co-orientador: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira  
Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ

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

**REITOR**

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr. Ângela Maria Isidoro de Farias

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr. Sílvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr. Suely Lins Galdino

## **AGRADECIMENTOS**

A Professora Suely Lins Galdino pela orientação, incentivo e credibilidade na realização deste trabalho.

Ao Professor Ivan da Rocha Pitta pela colaboração e atenção durante a realização desse trabalho.

A Professora Maria do Carmo Alves de Lima pela orientação, dedicação, conselhos e por não medir esforços em me ajudar.

A minha co-orientadora Valéria Rego Alves Pereira, pelo excelente trabalho que desenvolveu comigo e dedicação.

A professora Cristina Peixoto e a toda equipe do laboratório de microscopia eletrônica pela paciência, apoio e dedicação.

Ao professor Francisco Jaime pela contribuição, apoio e incentivo na realização desse trabalho.

Ao meu marido Amaro por respeitar minhas decisões e pelo incentivo e total apoio na realização de meus objetivos.

A minha amiga Anekécia Lauro por demonstrar enorme carinho, dedicação, paciência por está presente ao meu lado em todos os momentos na realização desse trabalho.

Aos meus pais por ter investido em mim e ter proporcionado o início da realização dos meus objetivos.

A minha irmã Taciana, minha avó e meu cunhado por acreditarem em mim.

Ao meu tio Omir Freitas, á quem devo todo meu respeito e admiração, por esta ao meu lado durante a grande jornada em minha vida.

As minhas amigas de antibióticos Juliana Cruz, Micheline Miranda, Andréia Apolinário, pelos momentos de descontração, conselho e incentivo.

A todos que fazem parte do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos Albert, Nathália Colaço, Sandrinha, Sandra Alcantara, Willams leal, Thiago Bento, Diana Malta, Antônio Sergio, Aracelly França, Vinicius, João Paulo, Amanda, Bárbara, Beatriz, Leidane, Giselle, Marina Pitta, Joelma, Jamerson, Sybelle, Felipe Freitas, Talita, Pedro, Camila, Thiago Aquino, Cleiton Diniz e Luiz Carlos em especial a Ricardo Olímpio.

Aos meus colegas do mestrado Juliana Dantas, Thiago Lins, Virginia Svedesse, Sura e Gisele.

As minhas amigas do Aggeu Maria Carolina, Marina de Assis, Karla Luna, Amanda Ferreira e Andresa Oliveira por se mostrarem sempre disposta a me ensinar e colaborar com o trabalho em equipe e pelos bons momentos de descontração e generosidade.

Aos meus companheiros de trabalhos Lucas Ferreira e Artur Felipe, pela excelente companhia, cumplicidade, seriedade nos trabalhos e principalmente pela amizade durante esse período.

Aos meus melhores amigos da UFPE “o grupo” Suzanne Brito, Jefferson José, Alexandre Trajano, Otoniel Rodrigues e Karina Wacemberg.

Aos meus colegas do Aggeu Magalhães Mineo e Conceição.

A Adenilda, secretária da pós-graduação pela atenção, dedicação e boa vontade em ajudar os alunos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

*Ao Meu Marido*

*Se você vier pro que der e vier comigo  
Eu te prometo o sol... se hoje o sol sair  
Ou a chuva... se a chuva cair  
Se você vier até onde a gente chegar  
Numa praça na beira do mar  
Um pedaço de qualquer lugar  
Este dia branco se branco ele for  
Esse tanto, esse canto de amor e você Quiser e  
vier pro que der e vier comigo  
Se branco ele for  
Esse canto, esse tanto, esse tão grande Amor,  
grande amor.*

**Dia Branco – Geraldo Azevedo**

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                     | <b>18</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>                                                  | <b>22</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                      | <b>24</b> |
| 3.1 Geral.....                                                               | 24        |
| 3.2 Específicos.....                                                         | 24        |
| <b>4 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                          | <b>26</b> |
| 4.1 DOENÇA DE CHAGAS.....                                                    | 26        |
| 4.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....                                             | 26        |
| 4.3 VETOR.....                                                               | 29        |
| 4.4 CARACTERÍSTICA BIOLÓGICA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....               | 30        |
| 4.4.1 Aspectos Morfológicos.....                                             | 31        |
| 4.4.2 Ultra-estrutura.....                                                   | 33        |
| 4.4.3 Ciclo Evolutivo.....                                                   | 34        |
| 4.4.4 Nutrição e Cultivo.....                                                | 36        |
| 4.4.5 Reprodução.....                                                        | 37        |
| 4.5 IMUNIDADE ADQUIRIDA CONTRA INFECÇÕES PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> ..... | 37        |
| <b>4.5.1 Resposta imune mediada por anticorpos .....</b>                     | <b>38</b> |
| <b>4.5.2Resposta imune mediada por células.....</b>                          | <b>39</b> |

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.2.1 Citocinas.....                             | 44        |
| 4.5.2.1.1 Interferon gama (IFN- $\gamma$ ).....    | 45        |
| 4.5.2.1.2 Interleucina 10 (IL-10).....             | 46        |
| 4.5.2.1.3 Interleucina 4 (IL-4).....               | 47        |
| 4.5.2.1.4 Interleucina 12 (IL-12).....             | 47        |
| <b>4.5.3 Imunoproteção e Imunopatologia.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>4.6 QUIMIOTERAPIA.....</b>                      | <b>50</b> |
| 4.6.1 Nifurtimox.....                              | 50        |
| 4.6.2 Benzonidazol.....                            | 52        |
| <b>4.7 PERSPECTIVA DE NOVOS FÁRMACOS.....</b>      | <b>53</b> |
| 4.7.1 Cruzipaina.....                              | 55        |
| 4.7.2 Catepsina B.....                             | 57        |
| 4.7.3 Prolil oligopeptidase.....                   | 57        |
| 4.7.4 Oligopeptidase B.....                        | 58        |
| 4.7.5 Aminopeptidases.....                         | 58        |
| 4.7.6 Inibidores da Biossíntese de Esteróis.....   | 59        |
| 4.7.7 Poliaminas e Via de salvação de purinas..... | 62        |
| 4.7.8 Balanço redutor/oxidativo.....               | 63        |
| 4.7.9 Metabolismo de açúcares.....                 | 65        |
| 4.7.10 Transferência de ácido siálico.....         | 67        |
| 4.7.11 DNA topoisomerase.....                      | 68        |
| <b>4.8 IMIDAZOLIDINAS.....</b>                     | <b>70</b> |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                  | <b>74</b> |
| 5.1 Parte Química.....                             | 74        |
| 5.2 Parte Biológica.....                           | 81        |
| <b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>               | <b>86</b> |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>7 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>8 PERSPECTIVAS.....</b> | <b>101</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>103</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ac** – Anticorpo

**Ag** – Antígeno

**ALDO** – Frutose difosfato aldose

**APC** – Célula apresentadora de antígeno

**BSA** – Albumina de soro bovina

**C'** – Sistema complemento

**CD** – Grupo de diferenciação; marcadores dos linfócitos

**CTL** – Linfócito T citotóxico

**FPC** - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

**GAPDH** – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**GDH** – Glicerol-3-fosfato desidrogenase

**GFI** - Glucose-6-fosfato isomerase

**GK** – Glicerolquinase

**GM-CSF** – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

**GP57/51** – Cruzipaína; Cruzaína

**GPI** – Glicosilfosfatidilinositol

**HK** – Hexoquinase

**IBE** – Inibidores de biossíntese de esteróis

**IC<sub>50</sub>** – Concentração inibitória em 50%

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**Ig** - Imunoglobulina

**IL** – Interleucina

**IP<sub>3</sub>** – Inositol trifosfato

**k-DNA** - DNA cinetoplástico

**LIT** - *Liver infusion triptose*

**ME** – Matriz extracelular

**MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade

**MP** - Membrana plasmática

**MTA** - Metiltionadenosina

**MTAF** - Metiltioadenosina fosforilase

**MTR-1P** - Metiltioribose-1-fosfato

**NK** – Células natural killer

**NO** – Óxido Nítrico

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**OpB** - Oligopeptidase B

**PFK** – Fosfofrutose quinase

**PGI** – Fosfoglicose isomerase

**PGK** – 3-Fosfoglicerato quinase

**POP Tc80** - Propil oligopeptidase de *T. cruzi*

**SMF** – Sistema mononuclear fagocitário

***T. cruzi*** – *Trypanosoma cruzi*

**T CD4<sup>+</sup>** - Linfócito T CD4

**T CD8<sup>+</sup>** - Linfócito T CD8

**TCR** – Receptor de célula T

**Tc-TOX** - Proteína citotóxica

**TGF-β** – Fator transformador de crescimento beta

**Th** – Células T helper

**TM** – Trifosfato isomerase

**TNF-α** – Fator de necrose tumoral

**TR** – Tripanotiona redutase

**TS** – Trans-sialidase

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Distribuição geográfica da Doença de Chagas.....                                                                                             | 27 |
| Figura 2 - Distribuição geográfica de casos confirmados da doença de Chagas no Brasil notificado no período de 2001-2006.....                           | 28 |
| Figura 3 - Distribuição geográfica das principais espécies de triatomíneos.....                                                                         | 29 |
| Figura 4 - Formas amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i> .....                                                                                   | 31 |
| Figura 5 - Formas epimastigotas.....                                                                                                                    | 32 |
| Figura 6 - Formas tripomastigotas.....                                                                                                                  | 33 |
| Figura 7 - Membrana plasmática do <i>T. cruzi</i> .....                                                                                                 | 33 |
| Figura 8 - Estrutura interna do <i>T. cruzi</i> .....                                                                                                   | 34 |
| Figura 9 - Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> .....                                                                                                     | 36 |
| Figura 10 - Padrões de citocinas de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> .....                                                                                  | 40 |
| Figura 11 - Função efetora das células Th1.....                                                                                                         | 41 |
| Figura 12 - Função efetora das células Th2.....                                                                                                         | 42 |
| Figura 13 - Controle da resposta imune.....                                                                                                             | 45 |
| Figura 14 - Ação biológica da IL-12.....                                                                                                                | 48 |
| Figura 15 - Mecanismo de ação de nifurtimox e benzonidazol.....                                                                                         | 51 |
| Figura 16 - Estrutura química do nifurtimox.....                                                                                                        | 52 |
| Figura 17 - Estrutura química do benzonidazol.....                                                                                                      | 53 |
| Figura 18 - Estrutura cristalográfica da cruzaina de <i>T. cruzi</i> . e inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas.....                  | 56 |
| Figura 19 - Biossíntese do ergosterol e colesterol.....                                                                                                 | 60 |
| Figura 20 - Estrutura química do itraconazol.....                                                                                                       | 61 |
| Figura 21- Estrutura química do cetoconazol.....                                                                                                        | 61 |
| Figura 22 - Estrutura química do D0870.....                                                                                                             | 62 |
| Figura 23 - Estrutura química do posaconazol.....                                                                                                       | 62 |
| Figura 24 - As vias de síntese de poliaminas do balanço oxi-redutor e de salvação de purinas são integradas e interdependentes no <i>T. cruzi</i> ..... | 64 |
| Figura 25 - Reação de conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, catalisada pela enzima GAPDH.....                                  | 66 |
| Figura 26 - Inibidores de origem natural da enzima GAPDH. (A) cumarina; (B) flavonóides; (C) ácido anacárdicos.....                                     | 66 |
| Figura 27 - Transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasito pela ação da enzima trans-sialidase.....                                       | 68 |
| Figura 28 - Inibidores de DNA topoisomerase.....                                                                                                        | 69 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 29 - Obtenção da hidantoina.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 70 |
| Figura 30 - Fórmula estrutural da imidazolidina.....                                                                                                                                                                                                                                         | 70 |
| Figura 31 - Fórmula estrutural da 2-tioxo-imidazolidina-4-ona.....                                                                                                                                                                                                                           | 71 |
| Figura 32 - Formas tautoméricas da imidazolidina-2,4-diona.....                                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| Figura 33 - Diagrama de síntese dos derivados imidazolidínicos (LPSF/NN).....                                                                                                                                                                                                                | 75 |
| Figura 34 - Estrutura química dos derivados LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100.....                                                                                                                                                                                                                    | 87 |
| Figura 35 - Estrutura química do derivado LPSF/NN-100 com o radical nitro<br>destacado.....                                                                                                                                                                                                  | 88 |
| Figura 36 - Produção de IFN- $\gamma$ em culturas de células esplênicas, após 6 dias do ensaio<br>experimental com o LPSF/NN-100.....                                                                                                                                                        | 89 |
| Figura 37A e B - Produção de NO em culturas de células esplênicas de camundongos<br>BALB/c. Após 24 e 48 horas do ensaio experimental com o LPSF/NN100.....                                                                                                                                  | 91 |
| Figura 38A e B - Produção de NO ( $\mu\text{g/mL}$ ) em culturas de células esplênicas de<br>camundongos BALB/c. Após 72h e seis dias do ensaio experimental com o LPSF/NN-<br>100 nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ , 10 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0,05$ )..... | 91 |
| Figura 39 - Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . tratados com o derivado<br>imidazolidínico LPSF/NN-52.....                                                                                                                                                                           | 93 |
| Figura 40 - Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . tratados com o derivado<br>imidazolidínico (LPSF/NN-100).....                                                                                                                                                                        | 94 |
| Figura 41A, B e C - Efeito dos derivados imidazolidínicos na viabilidade celular de<br>esplenócitos de camundongos após 24 horas.....                                                                                                                                                        | 95 |
| Figura 42 - Efeito dos derivados imidazolidínicos sobre a viabilidade celular de<br>esplenócitos de camundongos após 48 horas de ensaio.....                                                                                                                                                 | 96 |
| Figura 43 - Efeito dos derivados imidazolidínicos sobre a viabilidade celular de<br>esplenócitos de camundongos após 72 horas de ensaio.....                                                                                                                                                 | 97 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Universidades, instituições de ciências e tecnologia que promovem investigações científicas para a quimioterapia da doença de Chagas..... | 54 |
| Tabela 2 - Principais inibidores de cruzaina (Cz) .....                                                                                              | 56 |
| Tabela 3 - Efeitos <i>in vitro</i> dos derivados imidazolidínicos (LPSF/NN) .....                                                                    | 86 |

## RESUMO

Mais de um bilhão de pessoas no mundo (1/6 da população mundial) são acometidos por um ou mais tipos de doenças negligenciadas. Além da mortalidade, as doenças negligenciadas causam deficiências graves. A doença de Chagas representa um importante problema de saúde pública no continente Americano, o problema se agrava, pois a terapia disponível não é eficaz. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de novos derivados imidazolidínicos (LPSF/NN-20A, LPSF/NN-25, LPSF/NN-30, LPSF/NN-52, LPSF/NN-89, LPSF/NN-100, LPSF/NN-211). Estes derivados foram testados em diferentes concentrações sobre as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), e o valor de IC<sub>50</sub> foi calculado. Os resultados mostram que as moléculas apresentaram resultados satisfatórios para a atividade antiparasitária e citotoxicidade, quando comparados com o benzonidazol e nifurtimox, utilizados na quimioterapia da doença de Chagas. No entanto os compostos LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 destacaram-se por apresentar IC<sub>50</sub> de 13,17µg/ml e 12,8µg/ml respectivamente sob a forma tripomastigota. Desta forma, foi investigado o potencial efeito imumodulador do LPSF/NN-100 para a produção de IL-10, NO e IFN-γ em esplenócitos de camundongos BALB/c *in vitro*. O LPSF/NN-100 na sua concentração atóxica apresentou valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) para a produção de NO e IFN-γ. Investigando a possibilidade do LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 causarem alterações morfológicas nos parasitos, foi realizada a análise ultraestrutura onde se observou danos no complexo mitocondrial, citoplasma e núcleo com indícios de processo necrose. Para confirmar esses resultados foram realizados os ensaios de apoptose, apoptose tardia e necrose em esplenócitos de camundongos BALB/c. Apenas no tempo de 48 horas o LPSF/NN-100 induziu mais necrose em relação ao controle. Os resultados sugerem que o LPSF/NN-52 e o LPSF/NN-100 podem ser protótipos candidatos a quimioterapia da doença de Chagas.

**Palavras chave:** Doença de Chagas, Imidazolidínicas, Atividade antiparasitária.

## ABSTRACT

More than one billion people worldwide (1/6 of world population) are affected by one or more types of neglected diseases. In addition to mortality, neglected diseases cause severe disability. Although the disease still represents a major public health problem in the Americas, the problem worsens, because the available therapy is not effective. In this context, the objective of this study was to evaluate the activity of anti-*Trypanosoma cruzi* of new imidazolidine derivatives (LPSF/NN-20A, LPSF/NN-25, LPSF/NN-30, LPSF/NN-52, LPSF/NN-89, LPSF/NN-100, LPSF/NN-211). These derivatives were tested in different concentrations on trypomastigotes and epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) and the value of IC<sub>50</sub> was calculated. The results show that the molecules showed satisfactory results for the antiparasitic activity and cytotoxicity when compared with benznidazole and nifurtimox, used in chemotherapy of Chagas disease. However compounds LPSF/NN-52 and LPSF/NN-100 stood out for its IC<sub>50</sub> of 13,17µg/ml and 12,8µg/ml respectively in the form trypomastigote. Thus, we investigated the potential effect immunomodulator of LPSF/NN-100 for the production of IL-10, NO and IFN-γ in splenocytes from BALB/c mice *in vitro*. The LPSF/NN-100 in its non-toxic concentration values were statistically significant (p< 0,05) for the production of NO and IFN-γ. Investigating the possibility of LPSF/NN-52 and LPSF/NN-100 cause morphological changes in parasites, the analysis was performed ultrastructure where there was damage to the mitochondrial complex, cytoplasm and nucleus with evidence of necrosis process. To confirm these results were the tests to apoptosis, late apoptosis and necrosis in splenocytes from BALB/c mice. Only at the time of 48 hours the LPSF/NN-100 induced more necrosis compared to control. The results suggest that the LPSF/NN-52 and LPSF/NN-100 prototypes may be candidates for chemotherapy of Chagas disease.

**Keywords:** Chagas disease, Imidazolidines, Antiparasitic Activity.

# Introdução

---

## 1 INTRODUÇÃO

Após cem anos da sua descoberta, por Carlos Chagas, a doença de Chagas, continua sendo um grave problema de saúde pública. Ela tem promovido desafios de variada natureza, devido a complexidade de sua biologia, da dificuldade do seu tratamento e das inter-relações com problemas sociais e econômicos. Por consequência, a moléstia de Chagas tem estimulado estudos por diferentes grupos de pesquisa no Brasil, destacando-se a abordagem quimioterápica (MCKERROW, 2009).

A concepção de que a interação *Trypanosoma cruzi* e ser humano é uma ocorrência bastante antiga vem sendo comprovada por artigos científicos, os quais têm demonstrado a presença de material genético do protozoário em tecidos de múmias pré-colombianas, datada de nove mil anos (KROPF, 2000; GUHL, 2000; AUFDERHEIDE, 2004, ARAÚJO, 2009). Um dos aspectos que mais chamam à atenção no processo de descrição da Tripanossomíase Americana, a moléstia de Chagas, é o fato de a enfermidade somente ter sido identificada no início do século XX, durante as investigações realizadas pelo médico Carlos Chagas (CHAGAS, 1935; CHAGAS FILHO, 1979; CORRÊA, 1995). Em 1909, através de pesquisas realizadas em Lassance, o cientista brasileiro Carlos Chagas efetuou estudos científicos, até hoje sem similaridade, devendo-se a relevância de tais pesquisas ao fato meritório de ter descoberto, sem os recursos tecnológicos disponíveis atualmente, o ciclo completo da doença de Chagas, ou seja, o vetor, *Panstrongylus megistus*, o agente etiológico, (*T. cruzi*), o reservatório e os hospedeiros (CARVALHEIRO, 2009). Classificada no meio científico como doença negligenciada, sua prevalência e distribuição está intimamente relacionada a fatores ambientais, sócio-culturais e políticos (GURTLE, 2009). Essa doença constitui uma das principais causas de morte súbita que pode ocorrer com frequência na fase mais produtiva do cidadão (WILSON, 2005). Existem milhões de pessoas cronicamente infectados com *T. cruzi* (MONCAYO & SILVEIRA, 2009). No Brasil, estima-se a existência de cinco milhões de indivíduos com essa doença (FERREIRA, 2003).

O *T. cruzi*, agente etiológico da Tripanossomíase Americana, é um protozoário flagelado, pertencente ao filo *Sarcomastigophora*. Por ser eliminado junto à excretas do hospedeiro invertebrado, foi enquadrado na seção *Stercoraria*, enquanto outras espécies do gênero, na seção *Salivaria*, por serem transmitidas pela picada de seus respectivos transmissores (SIQUEIRA-BATISTA, 2007). A ultra-estrutura deste parasito é típica das

células eucarióticas contendo: membrana plasmática, citoplasma e núcleo. O ciclo biológico é complexo, marcado por uma série de transformações ao longo do seu processo vital (DE SOUZA, 2009).

Durante a infecção a respostas imunes inata e adaptativa, efetuadas por macrófagos, linfócitos B, T e citocinas controlam a parasitemia na fase aguda. A doença pode se estabelecer como uma infecção crônica que causa inflamação no coração ou no sistema nervoso. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produzem citocinas e são importantes para controlar a parasitemia e prevenir a mortalidade. O balanço entre citocinas Th1 que ativam macrófagos, causando a morte do parasita e citocinas regulatórias Th2 é necessário para promover a imunidade e reduzir a patologia. A cura parasitológica requer a geração de uma resposta imunológica eficiente que possa eliminar, ou controlar, o patógeno infectante. Apesar da resposta imune desempenhar papel crucial durante a infecção, a terapia antiparasitária também é necessária para prevenir a progressão da doença (BRITTO, 2009).

O uso de quimioterápicos específicos anti-*T. cruzi* é ainda insatisfatório e baseia-se em agentes nitroimidazol e nitrofurans tais como o Nifurtimox e Benzonidazol que foram desenvolvidos empiricamente. Há três décadas o estudo etiológico envolvendo o tratamento tem revelado que esses fármacos têm pouco ou nenhum efeito na fase crônica da doença, com taxa de cura variando de 0% a 19.1% (COURA & CASTRO, 2002). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a probabilidade de cura parasitológica aumenta, quando é realizado o diagnóstico rápido e é iniciado o tratamento específico (COURA, 2007).

No decorrer dos últimos anos poucas foram às mudanças efetivas no tratamento da moléstia de Chagas. Uma série de novos quimioterápicos, entre eles os inibidores da biossíntese de esteróis (IBE) e novos derivados triazólicos, são considerados as principais promessas no campo dos quimioterápicos contra a doença de Chagas (CARVALHEIRO, 2009).

Uma das etapas cruciais no desenvolvimento de um fármaco é a determinação da estrutura tridimensional do alvo. O conhecimento da sua arquitetura facilita o desenho de novos fármacos a partir do sítio ativo. Acredita-se que essa estratégia leve a obtenção de novas drogas.

Na busca da terapia eficaz, as imidazolidinas surgem como um grupo de derivados que apresentam variadas atividades biológicas. Esta classe de composto têm sido identificados e caracterizados para o desenvolvimento e a ação de potenciais fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

**Justificativa**

---

## 2 JUSTIFICATIVA

A terapia atual no tratamento da doença de Chagas está restrita ao uso de dois compostos: Benzonidazol e Nifurtimox. Porém, estes fármacos apresentaram baixa atividade sobre a fase crônica, induzem sérios efeitos colaterais e possuem limitada eficácia sobre os diferentes biotipos do *T. cruzi* que circulam em distintas áreas geográficas.

Desta forma, identifica-se a urgência de se obter novas alternativas terapêuticas ou mesmo profiláticas mais seletivas, tendo por base a caracterização de novas moléculas que possam atuar como agentes potenciais ou substâncias imunomoduladoras, para a quimioterapia da doença de Chagas e a identificação de vias e alvos metabólicos do parasito.

Baseado nesse desafio, o Grupo de Pesquisa do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF-UFPE) e o Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPQAM) identificou e avaliou uma série de derivados imidazolidínicos, como potenciais fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

# Objetivos

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Estudar *in vitro* a atividade anti-parasitária, imunomoduladora e estrutural de derivados imidazolidínicos sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Específicos

Avaliar em culturas de células esplênicas de camundongos a atividade citotóxica dos derivados da série 5-benzilideno-3-(2,4-diclorobenzil)-2-tioxo-imidazolidín-4-ona obtidos por meio sintético;

Determinar *in vitro* a atividade anti-parasitária dos sete derivados sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;

Estudar *in vitro* em sobrenadantes de cultura o potencial efeito imunomodulador do composto LPSF/NN-100 em sobrenadantes de cultura através da quantificação da produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e Óxido Nítrico;

Analisar através de microscopia eletrônica a ação dos compostos LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 na estrutura de formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;

Avaliar por citometria de fluxo a possível participação dos compostos LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 na indução de apoptose, apoptose tardia e necrose em esplenócitos de camundongos BALB/c.

# Revisão da Literatura

---

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, cujos vetores são insetos da família *Reduviidae* e da subfamília *Triatominae* (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Atualmente existem 140 espécies reconhecidas de vetores da doença (GALVÃO, 2006; FORERO, WEIRAUCH & BAENA, 2004; COSTA, ARGOLO & FÉLIX, 2006; BÉRENGER & BLANCHET, 2007; PARTTERSON, 2009).

Acredita-se que a doença de Chagas tenha origem multifatorial, concorrendo para a sua instalação mecanismos do hospedeiro (sistema imune comprometido) e do protozoário (ação lesiva) (PARODI, 2009). Convém lembrar que há fatores atuantes na patogênese que são inerentes ao agente infeccioso, como seu poliformismo, constituinte antigênico e tropismo celular, alguns são particulares ao inseto vetor, por exemplo, o sistema endócrino dos triatomíneos, e outros são próprios do hospedeiro, como susceptibilidade, co-infecção e distúrbio imunológico (COURA, 2009).

Esta doença apresenta ampla gama de manifestações clínicas, em consequência das complexas possibilidades de interação entre *T. cruzi* e os diferentes tipos celulares do hospedeiro, tais como macrófagos, células musculares e os neurônios (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

A doença de Chagas possui duas fases consecutivas: aguda e crônica. A infecção aguda é geralmente assintomática ou pode se manifestar como uma doença febril que dura 4-8 semanas, tendo como principal característica o aparecimento de edemas, chagoma e sinal de Romanã, a infecção aguda é seguida por uma fase crônica, que pode ser: indeterminada, cardíaca e digestiva. As manifestações clínicas da doença de Chagas crônica estão relacionadas ao envolvimento patológico do coração, esôfago e/ou cólon (RASSI, 2009).

### 4.2 Distribuição Geográfica

Historicamente, a doença de Chagas acometia pacientes restritos a áreas rurais da América Latina, onde as precárias condições habitacionais permitiam amplo contato com o triatomíneo infectado. O recente controle parcial da transmissão vetorial em alguns países da América Latina (Uruguai em 1997, Chile em 1999 e Brasil em 2006), a obrigatoriedade das

reações sorológicas no contexto transfusional na década de 80 e as correntes migratórias urbanas e para fora da América Latina mudaram o perfil epidemiológico da doença (DIAS, 2007).

Um novo conceito de distribuição da doença de Chagas no mundo globalizado se estabeleceu por sua verificação em larga escala nos Estados Unidos da América, gerando a obrigatoriedade do controle transfusional nesse país desde 2006 (BERN, 2007). Estudos mostram casos notificados em alguns países da Europa, como a Espanha (GASCON, 2007), e mesmo em locais distantes como o Japão (TAKENO, 1999). Novas e surpreendentes formas de transmissão, como as ocorridas a partir de transplantes de órgãos, são descritas nos Estados Unidos e Canadá (BERN, 2007; MONCAYO, 2009).

A distribuição geográfica (Figura 1) da infecção chagásica se estende desde o sul dos Estados Unidos para o sul da Argentina e Chile, deixando 90 milhões de pessoas expostas à infecção (COURA & DIAS, 2009). De acordo com estimativas recentes, a doença de Chagas atinge entre 12 e 14 milhões de pessoas em 18 países endêmicos na América Latina.



Figura 1 – Distribuição geográfica da doença de Chagas (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

No Brasil, em função das migrações internas das últimas décadas, cerca de 70% dos infectados vive nas cidades. A doença ocorre em aproximadamente 36% do território nacional, atingindo mais de 2.450 municípios. As regiões em que há maior ocorrência estão no sudeste e noroeste do Rio Grande do Sul, nordeste de São Paulo, Triângulo Mineiro, oeste e noroeste do Estado de Minas Gerais, norte, centro e o oeste da Bahia, também merecendo destaque áreas de Goiás, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Ceará, Amazônia e o sul de Tocantins (DIAS, 2007; DIAS, PRATA & CORREIA, 2008; FIOCRUZ, 2007).

No Brasil, mesmo após o controle da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (Figura 2), vivemos o que se pode chamar de uma endemia urbana. Áreas antes preservadas como a Amazônia já apresentam casos (XAVIER, 2006), e são hoje também consideradas endêmicas. Além disso, números crescentes de surtos por transmissão oral têm ocorrido na Amazônia e na região sul do país (PINTO, 2008; TATTO, 2007). A forma aguda sobrevive nesses casos de transmissão oral, que se apresentam com particularidade, como a gravidade maior associada as de maior inóculo (PINTO, 2008).

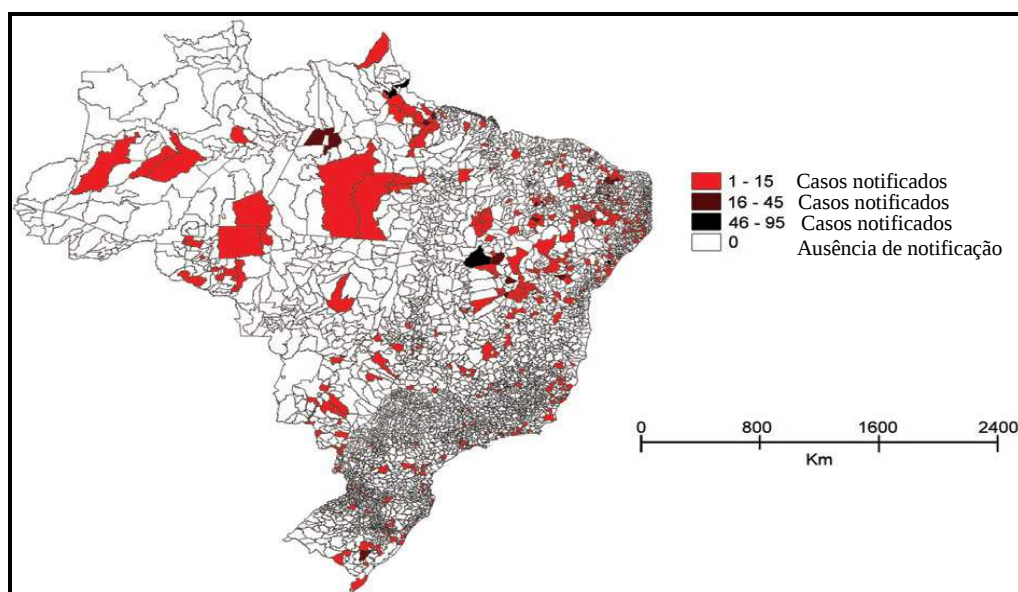


Figura 2 - Distribuição geográfica de casos confirmados da doença de Chagas no Brasil notificado no período de 2001-2006. A confirmação de casos foi classificada em quatro categorias, de acordo com os números de casos notificados na cidade (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2009).

### 4.3 Vetor

Mais de 130 espécies foram consideradas potenciais vetores de *T. cruzi*. No Brasil, 52 espécies de triatomíneos foram descritos, mas cinco têm especial importância epidemiológica, porque fazem parte do ecótopos domiciliares (Figura 3): *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*. As outras 47 espécies são selvagens e mantêm um ciclo natural apenas com mamíferos silvestres. *T. infestans*, que é a única espécie estritamente doméstica, foi eliminada no Brasil, Chile e Uruguai, e sua erradicação ou controle de outros países da América do Sul está em andamento (COURA & DIAS, 2009). O controle é feito com, melhores condições de habitação e o uso de inseticidas (MONCAYO, 2009).

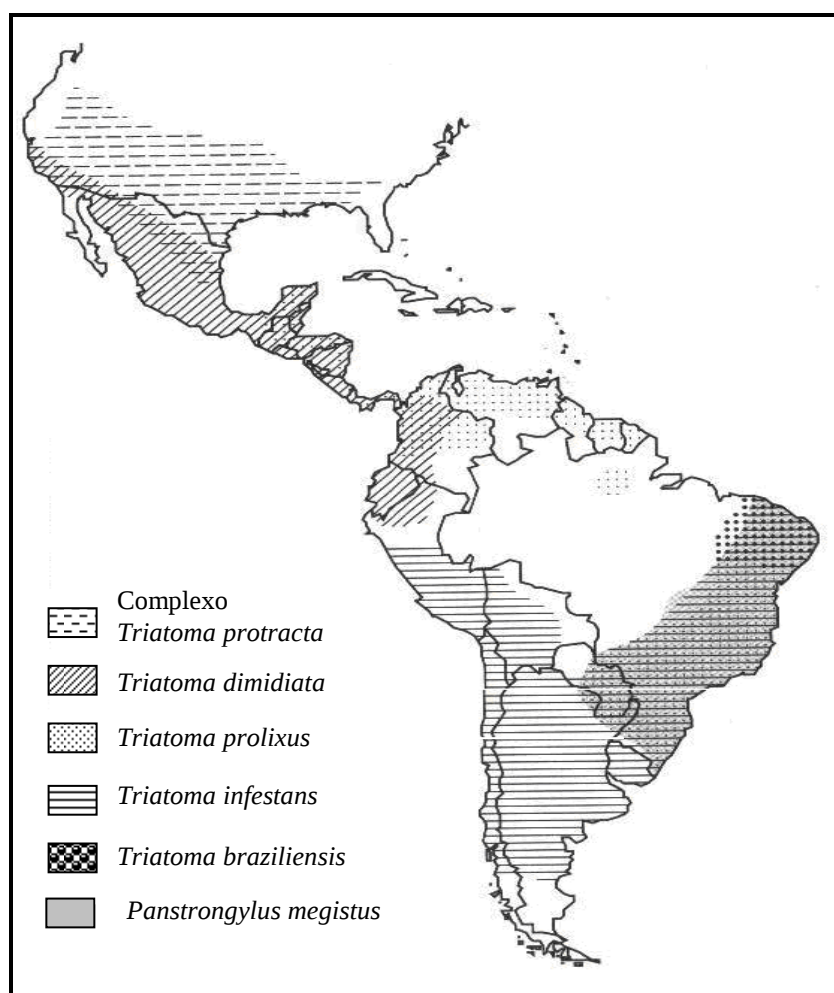


Figura 3 – Distribuição geográfica das principais espécies de triatomíneos (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

A primeira descrição do mecanismo da picada dos triatomíneos foi realizada em 1910 por Artur Neiva, hoje se sabe que a saliva contém uma série de substância que auxiliam na tarefa da alimentação, pois inibem os danos mecânicos decorrentes da atuação das peças bucais sobre a pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Por outro lado, tais substâncias também provocam uma série de respostas fisiológicas, como a liberação de componentes hemostáticos que evitam a perda do sangue do hospedeiro, por meio dos mecanismos de agregação plaquetária, coagulação do sangue e/ou vasoconstricção, assim como inflamação pela liberação da prostaglandinas, histamina e/ou serotonina. Esta substância, por sua vez, alerta o hospedeiro sobre a presença de um estímulo doloroso, facilitando sua eliminação, e a resposta imunológica relacionada ao local da picada, como liberação de interleucinas, histaminas, ativando a resposta de mastócitos e macrófagos e a resposta humoral. Os triatomíneos, ao se alimentarem, inoculam nos hospedeiros a saliva, que contém grande variedade de atividades biológicas, incluindo anticoagulantes, vasodilatadores, moléculas responsáveis por atividade anestésica, molécula formadora de poro, agente inibidor do complemento, inibidores de agregação plaquetária induzida por colágeno, ADP, ácido araquidônico, trombina, serotonina, epinefrina e norepinefrina (RIBEIRO & FRANSCISCHETTI, 2003).

#### **4.4 Característica biológica do *Trypanosoma cruzi***

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado digenético pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, é um dos parasitos de maior distribuição na natureza. Capaz de infectar um amplo espectro de mamíferos, distribuídos entre oito ordens. Este parasito é transmitido principalmente através de contaminação de fezes infectadas do triatomíneo. (COSTA, 2009).

O *T. cruzi* não representa uma população homogênea, sendo constituído por diversas cepas, observando-se a variabilidade genética entre elas (MATTEI, 1977). Uma das primeiras sugestões de caracterização biológica do *T. cruzi* foi feita por Brener (1977), ao propor as cepas Y e CL como cepas polares, representantes da substantiva variabilidade intra-específica do protozoário. De fato, em camundongos, a infecção pela cepa Y, a qual possui tropismo por macrófagos, causa elevada parasitemia e evolução para o óbito; já a cepa CL, prioritariamente miótrópica, ou seja, lesiva ao tecido muscular liso do intestino formando infiltrado inflamatório no local, produz comparativa infecção de menor gravidade (PENA, 2009).

Os principais critérios utilizados na caracterização das diferentes cepas do *T. cruzi* são origem geográfica; espécies de hospedeiros; virulência e patogenicidade; formas clínicas e epidemiológicas; sensibilidade a quimioterápicos; biodemas, características morfológicas e histopatológicas observadas na infecção experimental pelos agentes; zimodemas, caracteres isoenzimáticos específicos do parasito; esquizodemas, características do DNA cinetoplásticos e DNA ribossômico (PENA, 2009).

Independente do esquema classificatório empregado, não se pode perder de vista que o grande objetivo dos agrupamentos propostos é o estabelecimento de correlações entre a cepa infectante e os aspectos clínicos, patológicos, terapêuticos e epidemiológicos da moléstia de Chagas (ANDRADE, 2005; BRENER, 1979).

#### 4.4.1 Aspectos Morfológicos

O protozoário apresenta três forma evolutivas identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (BRENER, 1973; BOURGUIGNON, 2006; HOARE & WALLACE, 1966; BRENER, 1997).

A forma amastigota é intracelular do *T. cruzi* encontrada nos tecidos do hospedeiro vertebrado (Figura 4), não possui flagelo exteriorizado nem membrana ondulante, daí seu movimento ser de rotação, medindo cerca de 4µm de diâmetro. Multiplica-se por divisão binária longitudinal a cada 12 horas, transformando-se em tripomastigota sanguíneo, aproximadamente 11 a 13 horas antes da ruptura da célula. De acordo com os mecanismos de transformação, sua morfologia pode ser fusiforme ou arredondada (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

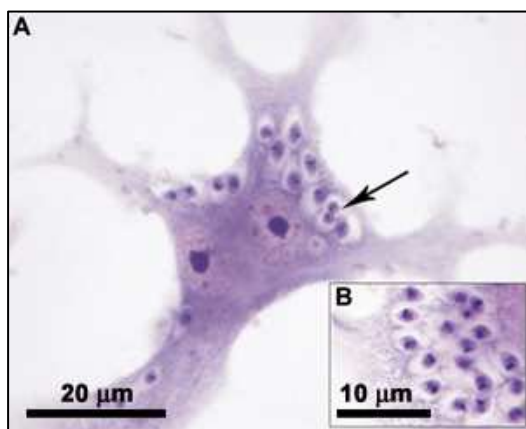


Figura 4A e B - Formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* ([www.fiocruz.com.br](http://www.fiocruz.com.br))

A forma epimastigota (Figura 5) é a morfogenética que se localiza no tubo digestivo do triatomíneo, sendo também encontrada nas glândulas anais dos gambás. Apresenta flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida, medindo entre 20 e 40  $\mu\text{m}$ , incluindo o flagelo livre. O nucléolo é esférico e ocupa, na maioria das vezes, uma posição central no núcleo (LOPEZ-VELAZQUEZ, 2005). É bastante móvel e apresenta intensa atividade replicativa também por divisão binária longitudinal, havendo, em diversas ocasiões, a formação de rosáceas. Os epimastigotas não suportam temperatura de 37°C, desenvolvendo-se melhor na faixa de 20 a 28°C. Estas formas são incapazes de penetrar nas células do hospedeiro vertebrado, sendo intensamente fagocitada por macrófagos (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

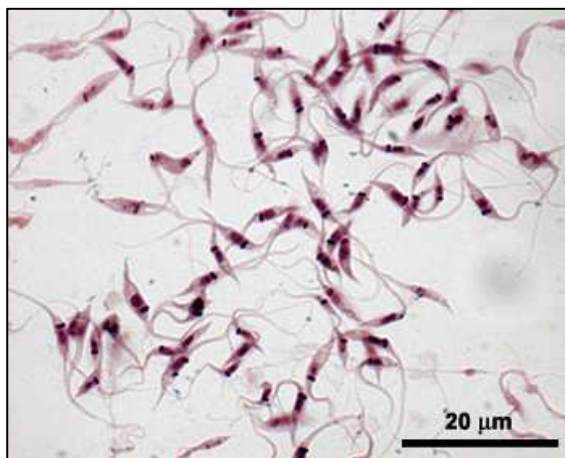


Figura 5 - Formas epimastigotas ([www.fiocruz.com.br](http://www.fiocruz.com.br))

Por outro lado, os tripomastigotas (Figura 6) não possuem capacidade replicativa, e correspondem à forma infectante, extracelular, localizada em ambos os hospedeiro: invertebrado – tripomastigota metacíclicos, vertebrado – tripomastigota sanguíneo ou sanguícola. Os tripomastigotas metacíclicos são encontrados nas porções finais do intestino, ou tubo de Malpighi do inseto vetor. Morfologicamente, assemelha-se às formas finas dos tripomastigotas sanguíneos, medindo em torno de 17 $\mu\text{m}$ . Apresentam núcleo grande e central, cinetoplasto com alta densidade de DNA, em posição terminal posterior. O flagelo é mais curto, emergindo do corpúsculo basal próximo ao cinetoplasto; a membrana ondulante é, em geral, estreita (DE SOUZA, 2007).

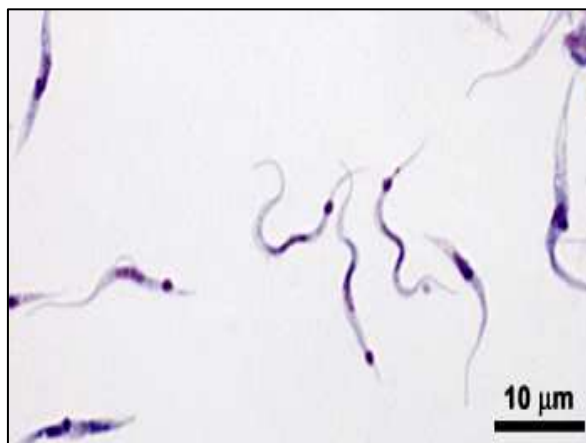


Figura 6 - Formas tripomastigotas ([www.fiocruz.com.br](http://www.fiocruz.com.br))

Os tripomastigotas sanguíneos estão localizados no sangue ou em outros líquidos corpóreos, como a linfa dos hospedeiros vertebrados. O flagelo, que emerge do corpúsculo basal próximo ao cinetoplasto, é longo, representando, em média, um terço do comprimento do protozoário. A membrana ondulante é estreita, medindo entre 12 e 20μm, incluindo o flagelo livre. Do ponto de vista morfológico, distinguem-se duas formas de tripomastigotas sanguíneas: finas ou delgadas e largas (DE SOUZA, 2008).

#### 4.4.2 Ultra-estrutura

Por ser um protista, a morfologia celular do *T. cruzi* é típica das células eucarióticas (Figura 7). A membrana plasmática (MP) do *T. cruzi* é composta por dupla camada lipídica, na qual estão “imersas” inúmeras proteínas. As proteínas estão distribuídas irregularmente, visto seu deslocamento pela bicamada lipídica (DE SOUZA, 2009).

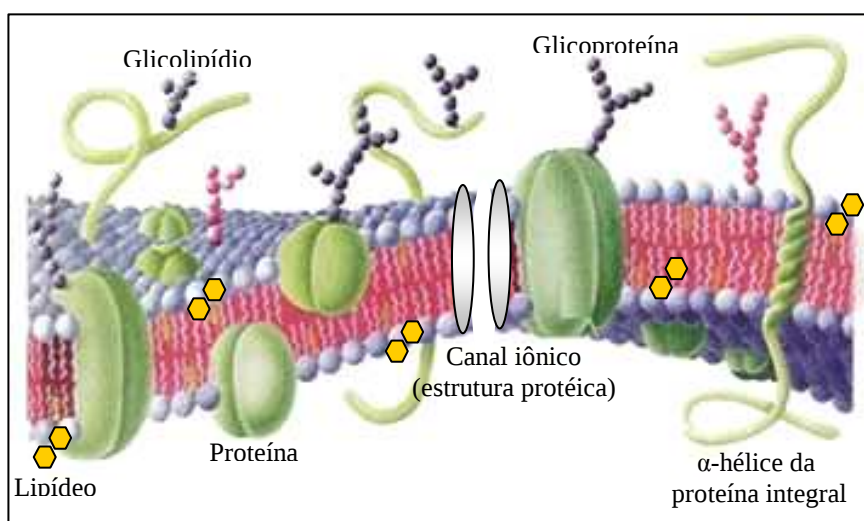


Figura 7 – Membrana plasmática do *T. cruzi* ([www.biogilde.wordpress.com](http://www.biogilde.wordpress.com))

Na face interna da membrana existem inúmeros microtúbulos, que se estendem de um extremo ao outro do flagelado (DANTAS, 2003). No exterior, observa-se um revestimento celular três vezes mais espesso nos tripomastigotas do que nos epimastigotas. Há também a presença de ácido siálico associado a glicopeptídios, os quais têm uma participação importante na interação *T. cruzi*/macrófago (DE SOUZA, 2009). Disperso no citoplasma estão o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ribossomos, possuindo também o cinetoplasto, conhecido como DNA cinetoplástico ou k-DNA (Figura 8). Diferente das demais ordens de eucariontes, as quais apresentam em torno de 1% do DNA celular nas mitocôndrias, o *T. cruzi* pode concentrar de 16% a 30% do DNA total no genoma mitocondrial (DIAS & MACEDO, 2005, ARAÚJO, 2009).

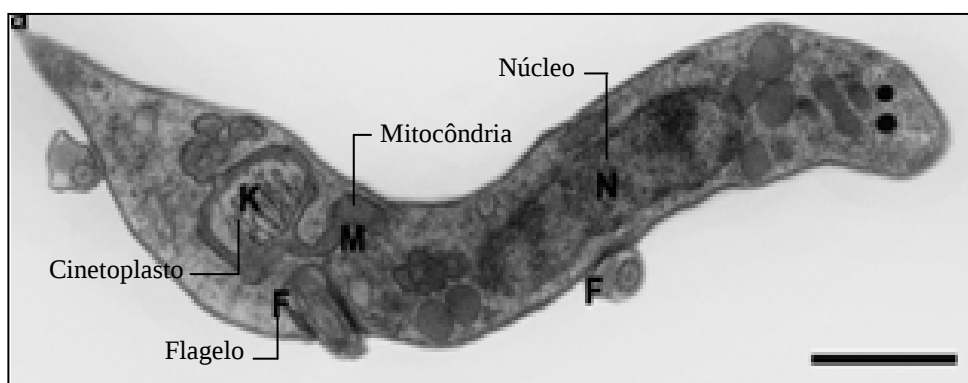


Figura 8 – Estrutura interna do *T. cruzi* (DE SOUZA, 2008)

A mitocôndria é única, tubular, possuindo paredes irregulares e cristais, com aspecto dependente do estágio parasitário analisado, tendo como elemento limitante uma dupla membrana mitocondrial; ademais, apresenta íntima relação com o cinetoplasto, havendo continuidade estrutural entre as paredes de ambas as organelas (SIQUEIRA-BATISTA, 2007; DE SOUZA, 2008; DE SOUZA, 2009).

#### 4.4.3 Ciclo Evolutivo

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é complexo marcado por uma série de transformações ao longo do seu processo vital (Figura 9). Ao realizar o hematofagismo, o triatomíneo infectado pelo protozoário recebe significativa quantidade de sangue em seu sistema digestivo, o que o força à eliminação da massa de excretas acumulada, constituída por fezes e urina, a qual é normalmente depositada na superfície da pele <sup>1</sup>. Estes dejetos contêm os tripomastigotas

metacíclicos, os quais, em razão de sua ativa movimentação e pela libertação de enzimas histolíticas, penetram ativamente através da pele (solução de continuidade recém-formada) ou da mucosa. Caso haja prurido, o que ocorre com grande frequência, a escoriação do local, pelas unhas, facilita a penetração do parasito, o qual pode ser transferido para outras regiões da pele ou para a mucosa ocular. Chegando à intimidade dos tecidos do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas são fagocitadas por elementos do sistema mononuclear fagocitário (SMF) local ou induzem fagocitose por outros tipos celulares (BRENE, 1997; WHO, 2002; SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

No vacúolo citoplasmático, os tripomastigotas realizam escape do vacúolo fagocitário, utilizando para isso uma proteína citotóxica (Tc-TOX), a qual apresenta certa homologia com as perforinas de linfócito T citotóxicos (BRENER, 1997). Neste ambiente, passarão por uma grande transformação estrutural (desaparecimento do flagelo livre e da membrana ondulante, arredondamento de sua forma, redução de tamanho), tornando-se amastigotas <sup>2</sup>. Tais formas sofrerão uma série de divisões binárias sucessivas, na maioria das vezes nove, sendo produzidos de 50 a 500 parasitos, dependendo da cepa de *T. cruzi* e do tipo celular envolvido <sup>3</sup>. Aproximadamente 12 horas antes da ruptura da célula, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneos, os quais, após a lise da célula parasitada, poderão invadir novas células nucleadas do hospedeiro vertebrado, principalmente as musculares lisas, esqueléticas, cardíacas e nervosas, viabilizando sua permanência no hospedeiro <sup>4</sup> (DUTRA, 2006).

O novo inseto transmissor então pica os doentes, e suga tripomastigotas presentes na corrente sanguínea <sup>5</sup>. Os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino do inseto, multiplicando-se intensamente por fissão binária <sup>6</sup> <sup>7</sup>. Alguns desses transformam-se em tripomastigotas novamente, e são expulsos com as fezes pelo inseto quando este pica outro indivíduo (os insetos barbeiros defecam frequentemente quando se alimentam para abrir espaço dentro dos seus exoesqueletos rígidos para mais sangue) <sup>8</sup>. O período necessário ao parasito para se multiplicar em suficiente número dentro do inseto para a picada deste ser infecciosa é de cerca de seis dias (DUTRA, 2006).

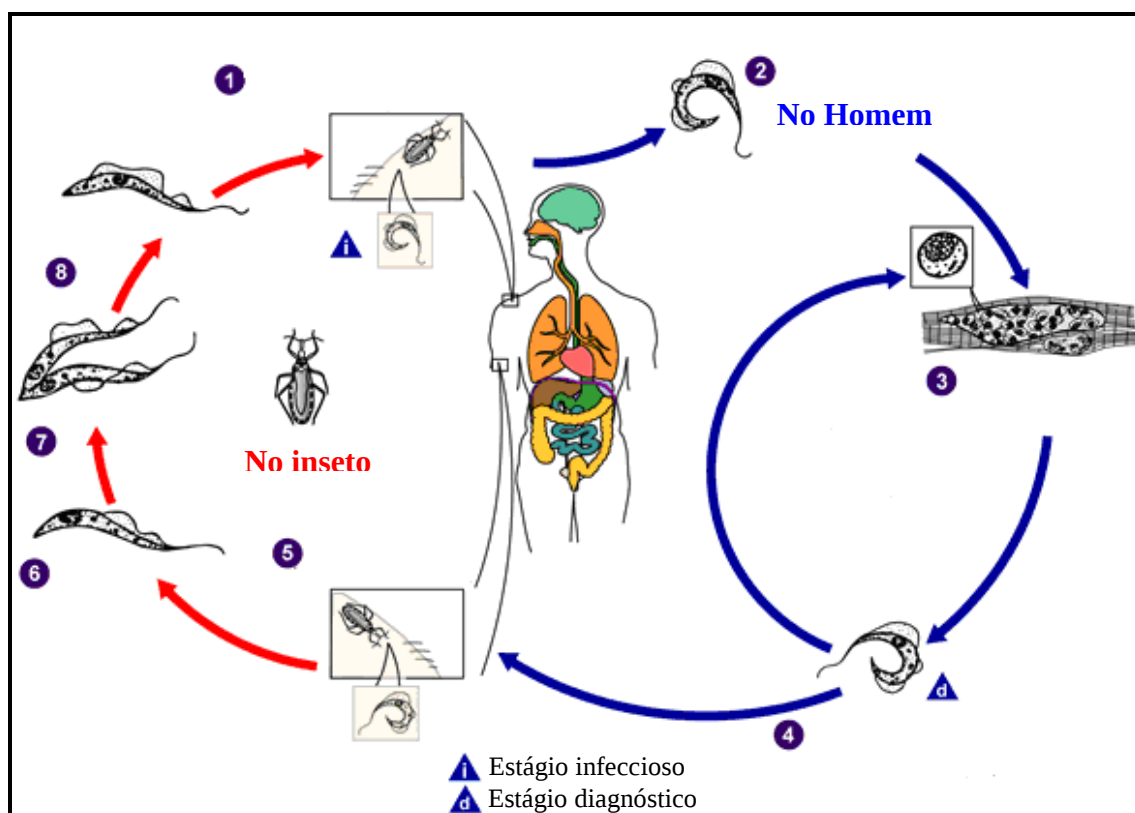


Figura 9 – Ciclo evolutivo do *T. cruzi* ([www.answers.com/topic/chagas-disease](http://www.answers.com/topic/chagas-disease))

#### 4.4.4 Nutrição e Cultivo

A nutrição do *T. cruzi* é realizada através da membrana celular, ou por pinocitose, já que os vacúolos pinocíticos foram observados nas proximidades do bolso flagelar. O consumo de carboidratos e de oxigênio é alto. A presença de heme no meio em que o *T. cruzi* se encontra é fundamental, na medida em que esse protozoário é incapaz de sintetizar esta vital molécula, imprescindível para a produção de seus citocromos (SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

Como o flagelado não pode sintetizar aminoácidos a partir de sais de amônio e fontes de carbono, é indispensável uma fonte rica de ácidos aminados, como triptose, peptona e mesmo soro. É bastante provável que o notável crescimento do flagelo em meios ricos de aminoácidos seja uma consequência da sua eficiente utilização como fonte de carbono (CANÇADO, 1968).

O crescimento em culturas do *T. cruzi* segue o padrão logístico, havendo seu incremento com aumento proporcional de temperatura, até um ponto crítico (32°C). A temperatura usual de incubação é de 28°C. O principal meio de cultivo do flagelado é o *liver*

*infusion triptose* (LIT), esse meio permite obter uma taxa de crescimento significativa tanto na velocidade de multiplicação, como no rendimento bruto de flagelado. Nesse meio acelular, há predomínio de crescimento de epimastigota, necessitando-se de utilizar culturas de fibroblasto e macrófagos, células epiteliais, miocárdicas, entre outras, para o crescimento e desenvolvimento de amastigotas e tripomastigotas (CANÇADO, 1968; SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

#### 4.4.5 Reprodução

A multiplicação do *T. cruzi* ocorre apenas nos amastigotas e nos epimastigotas, a sequência aceita para a divisão é: duplicação do k-DNA; duplicação do corpúsculo basal com a produção de um segundo flagelo; divisão do cinetoplasto por estrangulamento da porção média; divisão nuclear por endomitose; divisão citoplasmática a partir da extremidade flagelar até a porção posterior do protozoário; formação da mitocôndria a partir da parede do cinetoplasto (ARAÚJO, 2009).

#### 4.5 IMUNIDADE ADQUIRIDA CONTRA INFECÇÕES PELO *Trypanosoma cruzi*

Os protozoários apresentam variadas propriedades estruturais e bioquímicas, ciclos de vida e mecanismo patogênico. Não é surpreendente que diferentes parasitos desencadeiem respostas imunológicas distintas. Com a evolução de algumas espécies, os protozoários patogênicos desenvolveram mecanismos para sobreviver dentro de células do hospedeiro, de modo que a imunidade protetora contra esses organismos é mediada por mecanismos semelhantes aqueles que eliminam bactérias e vírus intracelulares (ABBAS, 2008).

As manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasito. Em cada fase da doença, existe uma resposta imune específica com um repertório de células e citocinas, que reduzem a parasitemia, auxiliando na defesa do organismo, mas que podem também estar envolvidos no desenvolvimento da patologia (BRODSKYN & BARRAL-NETTO, 2000).

Os eventos que se sucedem após a introdução do parasito no organismo incluem primeiramente, os mecanismos da reação inflamatória, através do recrutamento de células “Natural Killers” (NK), neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Todas essas células possuem

receptores, que com o auxílio do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , ativam macrófagos para produzir citocinas (IL-1 e IL-6) e óxido nítrico (NO) e, em seguida, a instituição da resposta imune adaptativa, a qual é capaz de reduzir a parasitemia, caracterizando a evolução para a fase crônica (GAZZINELLI, 1992; BRENER & GAZZINELLI, 1997; ANDRADE, 1991).

A resistência ao *T. cruzi* é oferecida pelas células NK, que são subgrupo de linfócitos, e que funcionam em respostas imunes inatas destruindo as células infectadas por secreção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e por mecanismos líticos através da liberação extracelular de seus conteúdos ou por indução de apoptose (DELVES, 2006). As células NK são capazes de inativar formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea, limitando assim, a propagação da infecção (LIEKE, 2004).

Sathler-Avelar et al. (2003) demonstraram que o início da fase aguda da doença de Chagas não está associada com a ativação de monócitos ou mudanças nas células natural killer (NK). No entanto, a fase aguda tardia é caracterizada por um aumento seletivo de uma linhagem distinta de células NK (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>), considerando que pacientes no início da fase indeterminada da doença mostram expressão aumentada de HLA-DR (antígeno de classe II do MHC) em monócitos. Vitelli-Avelar et al. (2006) ainda confirmou estes achados, demonstrando que a expansão das células NK (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>) antes do desenvolvimento da imunidade mediada por células T é uma característica da fase crônica. Além disso, a Vitelli-Avelar et al. (2006) demonstraram que, além da expansão das células NK (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>), níveis mais elevados de monócitos pró-inflamatórios (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) também foram observados durante o início da fase indeterminada doença.

#### **4.5.1 Resposta imune mediada por anticorpos**

Estudos indicam que os anticorpos (Ac) contribuem ativamente para a resposta à infecção, atuando em conjunto com as células do sistema imune. Os mecanismos mais importantes de destruição do parasito via Ac são a lise por ativação do sistema complemento (C') e a inibição da infecção por opsonização seguida de ingestão por células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) (UMEZAWA, 1993).

Geller et al. (1978) avaliaram os níveis de imunoglobulinas da classe IgE no soro de 14 pacientes clinicamente sintomáticos da doença de Chagas e 14 controles. Não foram

observadas diferenças entre os níveis desta imunoglobulina nos pacientes normais e nos infectados, levando a sugestão, de que as infecções por protozoários podem não alterar os níveis de IgE (GELLER & GELLER, 2000).

O *T. cruzi* é mais eficiente em induzir IgG2, imunoglobulina que é capaz de acionar o sistema complemento. Os Ac IgG1 se ligam mais avidamente aos mastócitos, nos quais atuam na atração de eosinófilos, na reação anafilática e na destruição do parasito (CERBÁN, 1992).

A ativação policlonal dos linfócitos B é dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e contribui para uma redução da parasitemia e eliminação das formas sanguíneas (MINOPRIO, 1986). Com a ativação de diversos clones de linfócitos B, são secretados Ac específicos aos antígenos (Ag) do parasito, inespecíficos a estes Ag e também reativos aos Ag do hospedeiro. Normalmente, o antígeno parasitário do meio extracelular é captado, englobado e processado por células apresentadoras de antígenos (APC) em um compartimento endocítico, sendo associada a moléculas do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II, com indução de células T CD4<sup>+</sup> (SCHARFSTEIN & MORROT, 1999). Estima-se que a maioria dos linfócitos B ativados não são específicos ao protozoário. As dificuldades em eliminar o parasito, pelo sistema imune podem ser devido, em parte, ao fato de o *T. cruzi* evocar uma resposta linfocitária T e B policlonal não específica, evitando assim um controle eficiente no início da infecção (MINOPRIO, 2001).

#### **4.5.2 Resposta imune mediada por células**

Diferentes tipos celulares atuam na resposta imune celular ao *T. cruzi*, cabendo destaque aos linfócitos, macrófagos e mastócitos. O *T. cruzi* é um potente ativador da resposta Th1, sendo capaz de estimular melhor a síntese de citocinas pró-inflamatórias que participam ativamente no processo de resposta imune celular, agindo como sinalizadores entre as células (OLIVEIRA, 2000).

Os linfócitos T desempenham várias ações que contribuem direta ou indiretamente para a resposta imunológica. Os mecanismos protetores incluem: secreção de citocinas ativadoras de macrófagos; aumento na produção e anticorpos específicos; função efetora e regulação da resposta imune. Entre as subpopulações de linfócitos T, os T CD4<sup>+</sup> e os T CD8<sup>+</sup> são os mais conhecidos quanto as suas funções protetoras (SACKS, 2002).

A população de células T CD4 é dividida nos grupos Th1, Th2, Th3 e Th17, distintos pelo perfil de secreção de citocinas (Figura 10).

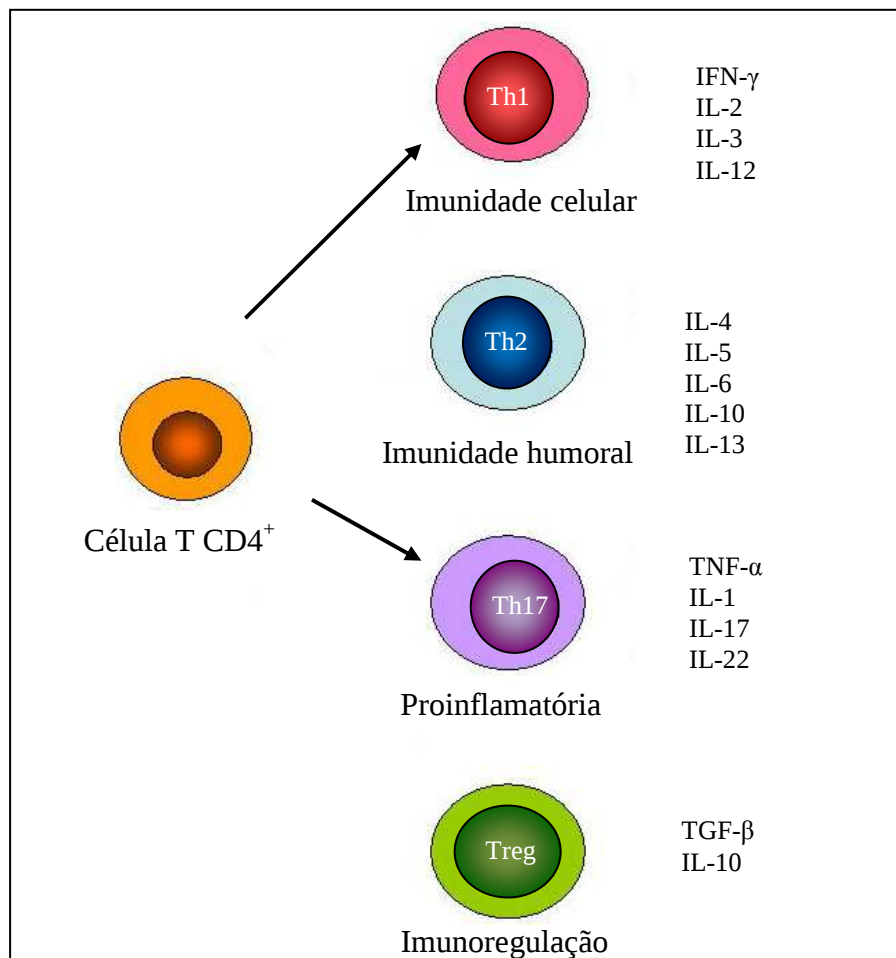


Figura 10 - Padrões de citocinas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Adaptada de LA CAVA, 2009)

Os linfócitos Th1, que auxiliam preponderantemente a resposta imune mediada por células, foram evidenciados como protetores do hospedeiro contra a progressão da infecção pelo *T. cruzi*. Os mecanismos responsáveis estão relacionados à liberação de citocinas, em particular o IFN- $\gamma$  e a IL-2. As principais ações desta subpopulação são a ativação macrofágica e o crescimento e diferenciação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CTL (Figura 11) (POWRIE & COFFMAN, 1993; ABBAS, 2008).

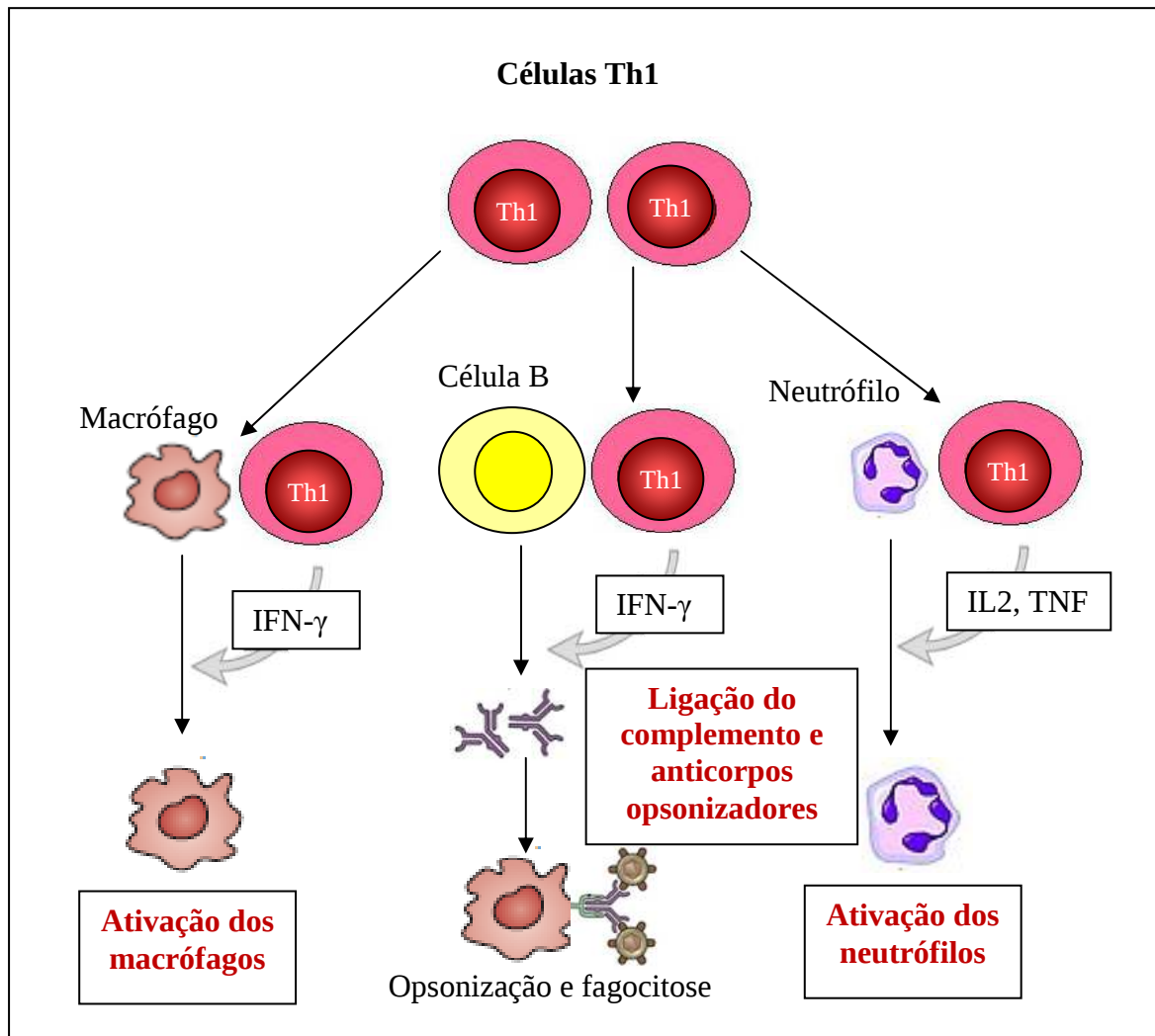


Figura 11 - Função efetora das células Th1 (Adaptado de ABBAS, 2008)

Já o subgrupo Th2, que atua através de citocinas antiinflamatórias, participa da indução da resposta humoral. As duas citocinas mais relevantes são a IL-4 e IL-10 (Figura 12).

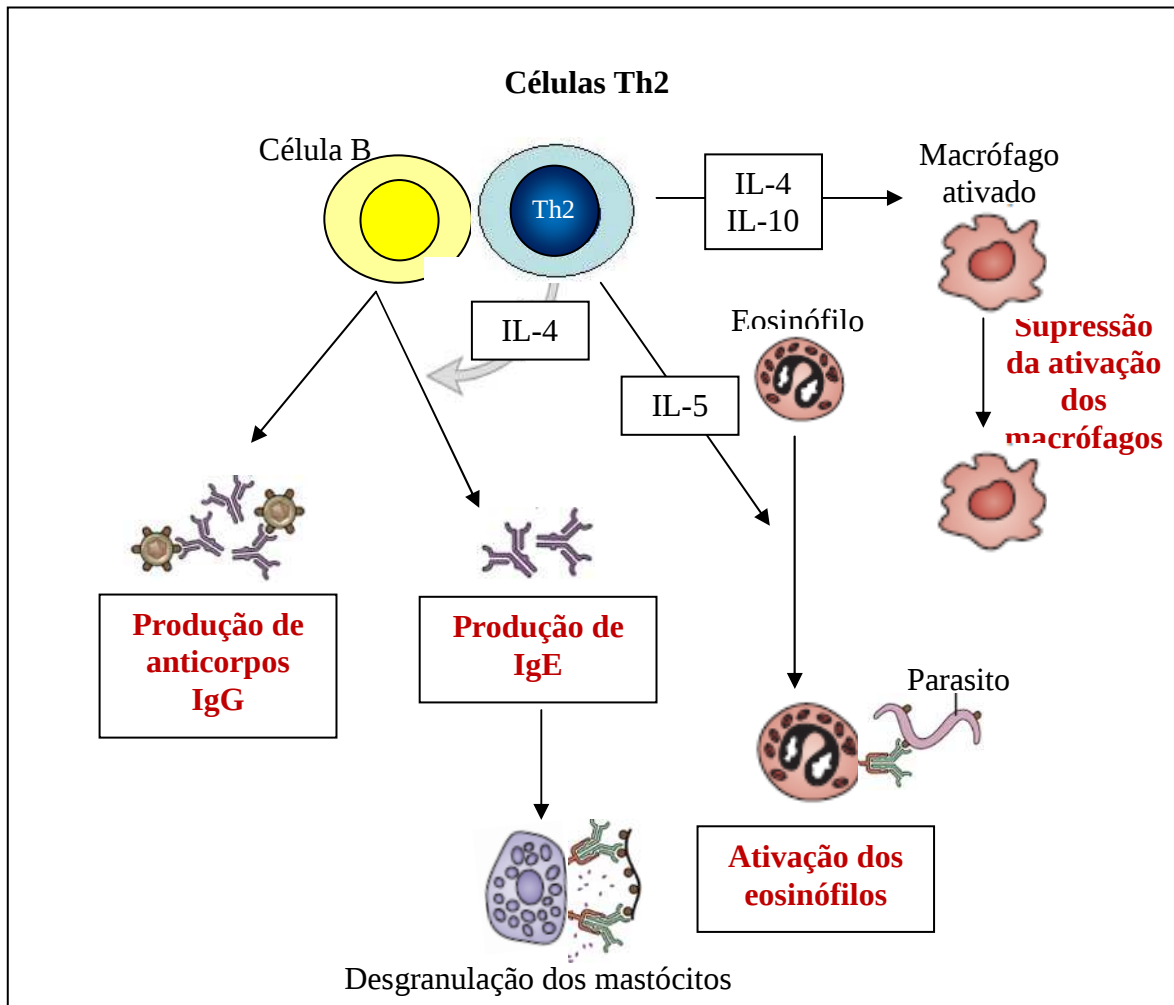


Figura 12 - Função efetora das células Th2 (Adaptado de ABBAS, 2008)

Recentemente vem sendo descrita uma terceira subpopulação, os linfócitos Th3, relacionados com a regulação do sistema imune, durante a infecção pelo *T. cruzi*. Uma das características dos linfócitos Th3 é a produção de TGF- $\beta$  (fator transformador de crescimento beta), essa citocina é capaz de atuar no crescimento de diferentes grupos celulares e no bloqueio da proliferação de linfócitos e à produção de linfócitos T citotóxicos (WAGHABI, 2005).

Mortara et al. (2005) demonstraram que o *T. cruzi* é capaz de ativar o TGF- $\beta$ , passo importante no processo de invasão celular. Ademais, o TGF- $\beta$  está associado à exacerbação da doença, com efeito na inibição da capacidade de macrófagos de proteger o hospedeiro das diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (SILVA, 1991).

Células Th17 foram recentemente identificadas como uma nova linhagem de células Th efetoras, essa subpopulação tem sido importante na resposta imune a agentes infecciosos

(DONG, 2008; EVANS, 2007). A citocina IL-17 produzida pelas células Th17 tem sido associada por muitos anos com a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e com doenças auto-imunes. No entanto, não ficou claro como a produção de IL-17 foi regulamentada (DONG, 2008).

Os Linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão envolvidos na produção de citocinas e na atividade citolítica, controlando a replicação *in vivo* do parasito e permitindo a resistência do hospedeiro (BRENER & GAZZINELLI, 1997). Esse tipo de linfócito é conhecido por sua atuação supressora (modulação do auxílio exacerbado por linfócitos T-helper a outros leucócitos) e citotoxicidade (CTL) (BLOOM, 1992). A relevância das células CTL na resistência é apoiada pela origem do Ag parasitário.

Na imunidade celular, os macrófagos atuam principalmente através da produção de óxido nítrico (NO), sendo um efetor essencial no desenvolvimento da resposta Th1 contra *T. cruzi*, controlando a replicação através secreção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12) e aumento de substâncias co-estimulatórias (GUTIERREZ, 2009).

A propriedade citoprotetora de baixos níveis de NO pode limitar o dano tecidual durante inflamação (DE GOUW, 2001). Curiosamente, o NO aumenta significativamente a proliferação, a divisão e a viabilidade das células T reguladoras (Treg) (SAKAGUCHI, 2004), um subconjunto de linfócito que tem sido apresentado por esta envolvida na infecção aguda experimental por *T. cruzi* (MARIANO, 2008). De fato, as células Treg induzidas pela estimulação NO são tão eficientes quanto as Tregs naturais em suprimir a diferenciação de diferentes subpopulações de linfócitos efetores (PACKARD & KHAN 2003).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o NO pode, modular direta ou indiretamente a maquinaria efetora de leucócitos através de diversos mecanismos. Este processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais livres (superóxido e peroxinitrito) gerados após a produção de NO, bem como a regulação da resposta inflamatória induzida durante este tipo de infecção. Portanto, o NO desempenha um duplo papel na imunidade. Essa dualidade imune é geralmente dependente da concentração de NO, que uma vez desregulada, pode causar a toxicidade celular no hospedeiro, auto-imunidade ou a persistência do parasito devido à evasão imune, os quais podem levar à patologia (GUTIERREZ, 2009).

Entre os mecanismos imunoregulatório, mais recentemente descrito, estão as células Tregs, que são fenotipicamente identificadas nos seres humanos como células  $CD4^+$   $CD25^{high}$ . As células Tregs têm emergido como um ponto central de controle na modulação de várias respostas imunes, incluindo reações auto-imunes e imunidade contra microorganismos infecciosos (PICCIRILLO, 2008). Vários mecanismos nos quais as células Treg podem exercer a sua atividade modulatória têm sido propostas em diferentes modelos de doenças, incluindo a inibição da atividade citotóxica por apresentação direta de antígeno ou através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (PICCIRILLO, 2008). A regulação da resposta imune específica contra o parasita é essencial para controlar a atividade efetora excessiva anti-*T. cruzi*. Na falta dessa regulação, a resposta imune acaba por induzir lesão dos tecidos. Uma vez que, componentes autoimune participam da cardiopatia chagásica, a regulação da resposta poderia ser necessária para controlar a reatividade (SATHLER-AVELAR, 2009).

#### 4.5.2.1 Citocinas

As citocinas, que possuem diferentes funções na resposta imune mediada por células, estão também envolvidas no binômio resistência/suscetibilidade. São proteínas solúveis ou glicoproteínas produzidas por leucócitos e outros tipos celulares, que atuam como mediadores de comunicação entre células do sistema imune (ABBAS, 2008). A progressão da enfermidade está diretamente relacionada com as citocinas atuantes durante o curso da infecção (ALIBERTI, 1996). O balanço entre as citocinas inflamatórias e antiinflamatórias produzidas ao longo da doença será fundamental para determinar o curso da infecção. Durante a fase crônica o diferencial da resposta imunológica, ao combate a infecção, pode ser o fator determinante que permite uma resposta imune bem controlada (forma indeterminada) ou uma resposta imune que controla a parasitemia, mas leva a patologia (formas clínicas cardíacas e digestivas) (Figura 13). A interação inicial entre o parasito e o hospedeiro é a provável chave para estabelecer o controle efetivo da parasitemia e ao mesmo tempo é crucial na formação de citocinas (GUITIERREZ, 2008; DUTRA, 2009)

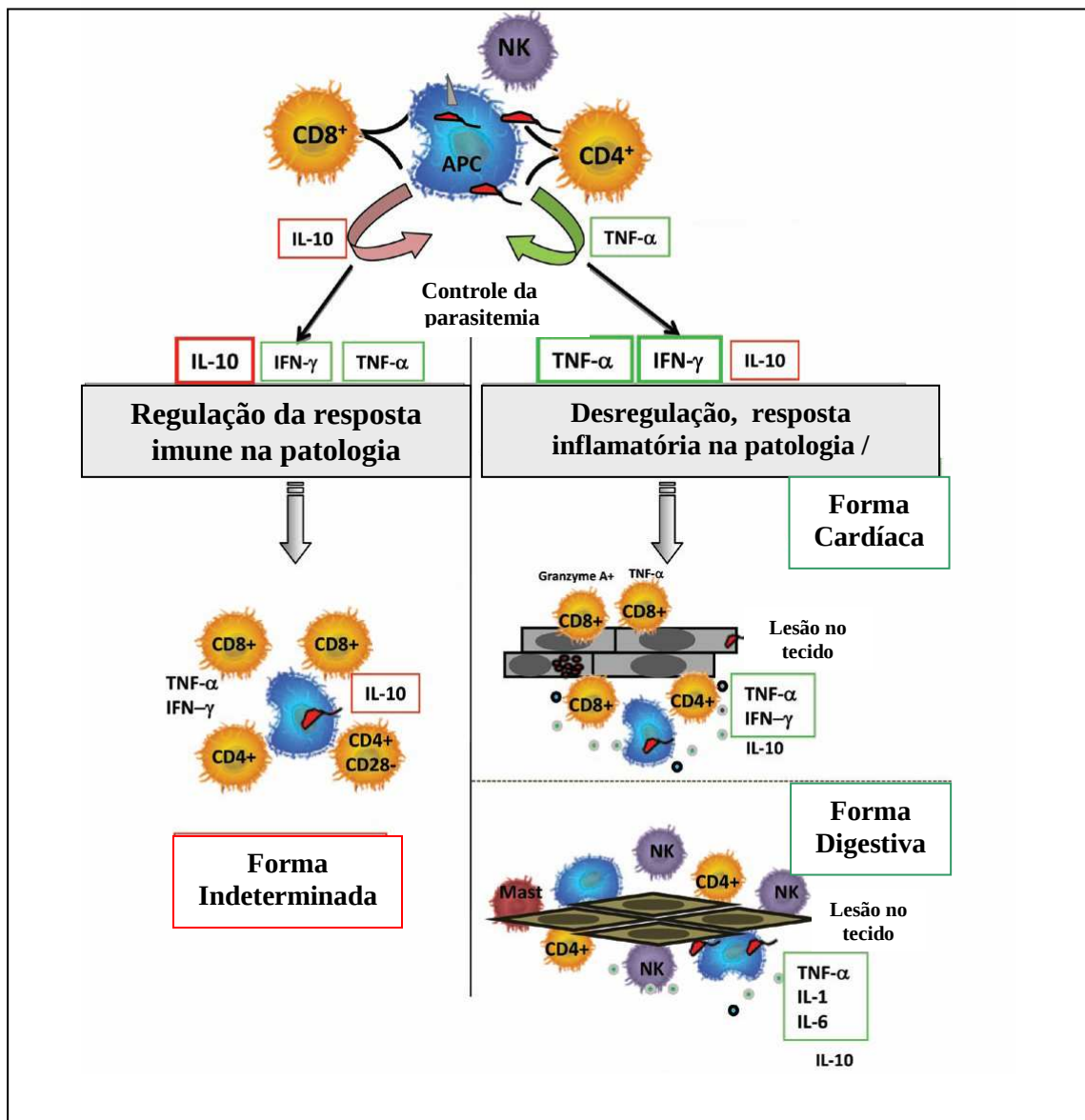


Figura 13 – Controle da resposta imune (DUTRA, 2009)

#### 4.5.2.1.1 Interferon gama (IFN-γ)

Entre as citocinas, o IFN-γ apresenta um papel crucial, por ser um potente ativador de macrófagos e estimulador do processo de destruição parasitária contra o *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium sp.* (REED, 1988). Torrico et al. (1991) avaliando a contribuição do IFN-γ no modelo murino da doença de Chagas, observaram que camundongos que receberam anticorpo monoclonal anti-IFN-γ, foram mais suscetíveis à infecção, apresentando parasitemia mais acentuada e mortalidade precoce, em relação aos camundongos selvagens.

Durante a fase inicial da infecção chagásica o IFN- $\gamma$  tem um papel protetor. A sua produção é estimulada pela IL-12 e realizada pelas células NK, células TCR (Receptor de Célula T)  $\alpha\beta$  duplo negativas, macrófagos e posteriormente pelos LT ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) (REIS & LOPES, 2000). O fato do IFN- $\gamma$  atuar como agente protetor na infecção atribui-se á sua capacidade de ativar a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO). Essa produção de IFN- $\gamma$  é regulada pelas citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (BRENER & GAZZINELLI, 1997). Além disso, desempenha papel central em induzir a ativação de macrófagos e a inibição da replicação intracelular dos parasitos (ARAÚJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Apesar da influência dos interferons IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  parecer menor do que a do IFN- $\gamma$  no controle da infecção *in vivo*, Plata et al. (1987) demonstrou que houve indução de resistência em cultura *in vitro*, além da diminuição da parasitemia quando administrado na doença de Chagas experimental. O TNF- $\alpha$  também ativa macrófagos, atuando sinergicamente com o IFN- $\gamma$ . Estudos recentes têm questionado a participação desta citocina no desenvolvimento de cardiopatia chagásica crônica (DRIGO, 2007; FERREIRA, 2003).

#### **4.5.2.1.2 Interleucina 10 (IL-10)**

A produção de IL-10 é necessária para minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de citocinas inflamatórias, IL-12 e IFN- $\gamma$ , produzidas durante a infecção. Em seus estudos experimentais Silva et al. (1992), avaliou o nível de IL-10 em culturas de esplenócitos de camundongos geneticamente resistentes, estes produziram menor quantidade de IL-10 quando comparado com os suscetíveis. Eles também observaram que quando os anticorpos monoclonais são direcionados contra a IL-10 há reversão da progressão da infecção em camundongos suscetíveis. Esses efeitos podem ser explicados pela ação inibitória da IL-10 ao subgrupo Th1 que libera as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2, que conferem resistência ao hospedeiro e pela desativação de macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  (SATHLER-AVELAR, 2009). Aparentemente os níveis de IL-10, são indicativos de resistência ou de suscetibilidade ao parasito (O'GARRA, 2007).

#### 4.5.2.1.3 Interleucina 4 (IL-4)

A citocina IL-4 assim como o IFN- $\gamma$  atua na resposta imune como estimuladora da eliminação do *T. cruzi* através dos macrófagos. Golden e Tarleton (1991) observaram que, quando se adiciona IFN- $\gamma$  em frações com IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, há um substancial aumento da capacidade tripanocida de macrófagos, chegando à esterilização intracelular *in vitro*. Este sinergismo desaparece somente quando Ac anti-IL-4 são adicionados no meio (HOFT, 2000). Contudo, ao serem colocados juntos IFN- $\gamma$  e IL-4 não há qualquer ação sinérgica aparente. É intrigante a ação de IL-4 em macrófagos nesta protozoose, visto que ela tem ação inibitória para células Th1, produtoras de IFN- $\gamma$ , e aumenta a suscetibilidade para outras infecções, como no caso de gênero *Leishmania* (HOFT, 2000).

#### 4.5.2.1.4 Interleucina 12 (IL-12)

A IL-12 é fundamental para iniciar sucessivos eventos durante a infecção por *T. cruzi*, que envolvem macrófagos, células NK e linfócitos T (Figura 14). A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, sintetizada pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) durante a infecção e é capaz de estimular células NK e linfócitos T a produzirem de IFN- $\gamma$ , o qual estimula os macrófagos a destruírem o parasito. Além disso, a IL-12 atua em conjunto com o IFN- $\gamma$  estimulando a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares em células Th1 e acentua as funções citotóxicas de células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8<sup>+</sup> (HOFT & EICKHOFF, 2002; ABBAS, 2008). Uma das mais surpreendentes disfunções observada em macrófagos infectados com parasitos é sua inabilidade em produzir IL-12 que, como o principal indutor fisiológico de interferon-gama e diferenciação de células T helper tipo (Th1), é uma citocina essencial para resistência adquirida a patógenos intracelular. O excesso da produção de IL-12 pode levar diversos danos aos tecidos e até mesmo mortalidade, uma consequência que pode também ser prejudicial ao parasito no bloqueio do ciclo de transmissão (SACKS, 2000)

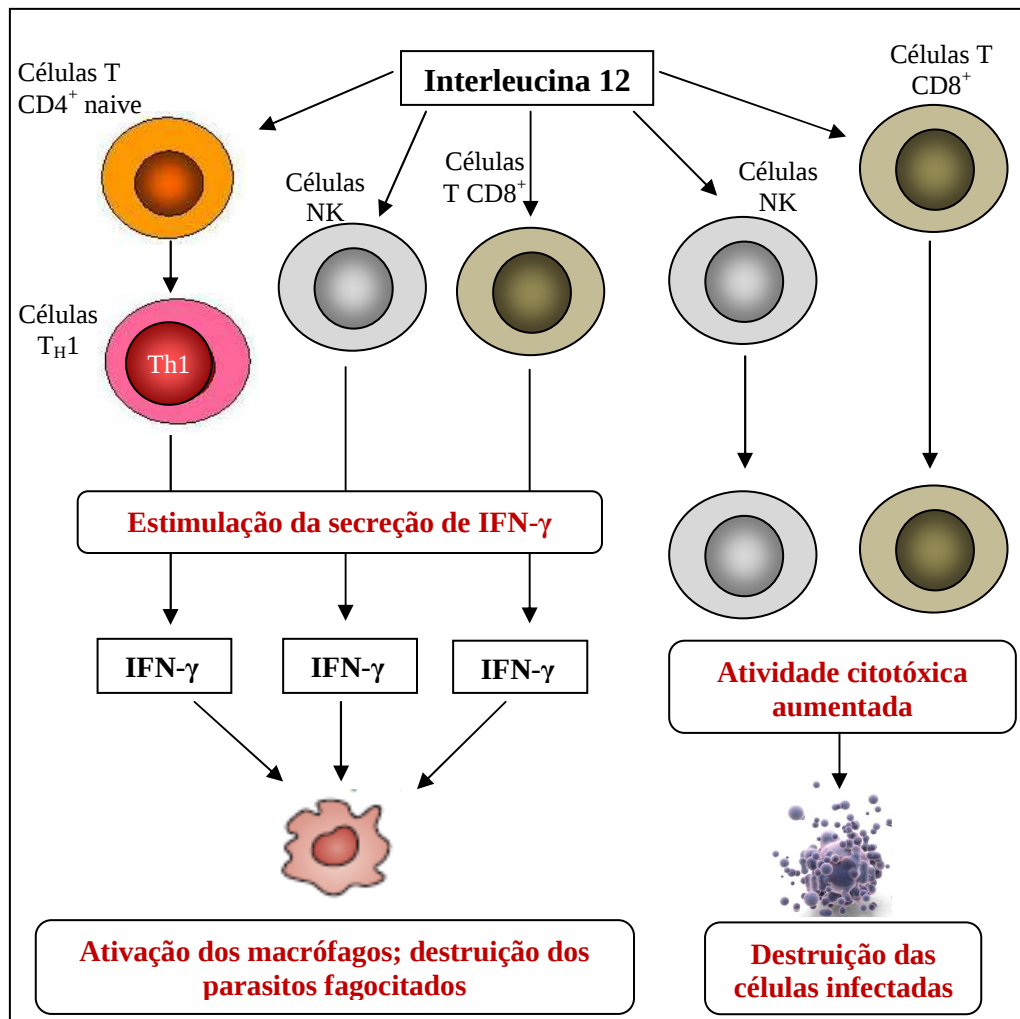


Figura 14 - Ação biológica da IL-12 (Adaptado de ABBAS, 2008)

#### 4.5.3 Imunoproteção e Imunopatologia

Durante a infecção por *T. cruzi*, o NO pode atuar direta ou indiretamente. Os mecanismos pelos quais o NO exerce função imunossupressora ainda não são claros. Entretanto, foi demonstrado que o NO pode inibir a apresentação de antígenos por macrófagos regulando negativamente a expressão de moléculas do (MHC). Além disso o NO pode alterar o funcionamento de complexos enzimáticos imprescindíveis para o metabolismo celular, inibir a duplicação de DNA ou causar danos diretos no DNA e induzir morte celular (GUTIERREZ, 2009).

Na infecção humana especificamente, na forma cardíaca da doença, há uma predominância de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que se mostram muitas vezes mais freqüentes que os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Na forma gastrintestinal da doença de Chagas, entretanto, há diminuição significativa no número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup> e de linfócitos B CD19<sup>+</sup> e inversão da

taxa de CD4/CD8. A caracterização da expressão gênica da doença de Chagas tem mostrado regulação positiva de respostas imunes, metabolismo lipídeo, fosforilação oxidativa mitocondrial e de alguns genes seletivos. Acredita-se que a regulação positiva de via de sinalização do IFN- $\gamma$  pode ser associada com hipertrofia do coração (DUTHIE, 2005).

Na fase aguda da infecção o coração é o órgão mais afetado, a infecção de fibroblastos e cardiomiócitos pelo *T. cruzi* pode retardar ou induz a apoptose da célula hospedeira (DOSREIS, 2009). A morte celular programada por apoptose é uma resposta biológica relevante para o desenvolvimento, a renovação do tecido e homeostase do sistema imune. Defeitos na regulação da apoptose pode levar a doenças. A apoptose pode também ser induzida em parasitos unicelulares, incluindo *Trypanosoma cruzi* (PIACENZA, 2001). Apoptose em alguns parasitos como *Leishmania*, é necessária para o estabelecimento bem sucedido da infecção no hospedeiro vertebrado (VAN ZANDBERGEN, 2006). Além disso, as formas infectantes da *Leishmania spp.* e *T. cruzi* apresentam fosfatidilserina extracelular, um marcador de células apoptóticas que está envolvido na inativação de macrófagos do hospedeiro e aumento da replicação do parasita (DAMATTA, 2007). Após a infecção pelo parasito, a apoptose de leucócitos dos hospedeiros desempenha um importante papel na regulação da resposta imune. Apesar dos progressos feitos nesta área, a importância da apoptose na patogênese da doença de Chagas permanece obscuro (DOSREIS, 2009).

A Necrose é descrita como uma morte celular não programada. A interação entre apoptose e necrose é modulada em resposta a estímulos diferentes. Originalmente necrose significa morte acidental de células e tecidos. As características deste tipo de morte envolvem alterações dramáticas na mitocôndria do *T. cruzi*, incluindo despolarização mitocondrial, depleção de ATP, geração de ROS, perda da homeostase do cálcio, vacuolização citoplasmática e, finalmente, degradação da membrana plasmática (ZONG & THOMPSON, 2006). Diferente de apoptose, o processo de reciclagem de células mortas em necrose é lento, devido à ausência de sinais de celulares específicos, levando a uma importante resposta inflamatória (DE CASTRO, 2009).

## 4.6 QUIMIOTERAPIA

Praticamente desde a sua descoberta, o tratamento da doença de Chagas vem sendo alvo de intenso estudo. A busca de drogas para o uso clínico pode ser dividida em três períodos: de 1909 a 1934, entre a descoberta da doença e a morte de Carlos Chagas, pouquíssimos estudos foram relatados; de 1935 a 1960, diversos compostos foram testados sem que houvesse drogas eficientes; o terceiro período, o mais produtivo, teve início em 1961 com a publicação dos estudos de Brener, que introduziu o esquema de tratamento de longa duração e consolidou os critérios de avaliação terapêutica (COURA & CANÇADO, 2009).

Entre 1960 e 1970, dois nitroderivados, nifurtimox (nitrofurano) e benzonidazol (nitroimidazol), foram introduzidos na quimioterapia da doença de Chagas. O nifurtimox, (3-metil-4(5'-nito-furfurilideneamino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1dióxido) mostrou-se o mais ativo, entre diversos derivados 5-nitrofurfurilidenos testados. Já o benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) foi sintetizado por Wineholt e Liebman (BOCK, GONERT & HABERKORN, 1969).

O relativo sucesso de nifurtimox e benzonidazol encorajou a pesquisa de outros nitro-heterocíclicos, mas muitos já se mostravam menos potentes em modelos experimentais. Dados recentes também têm fortemente sugerido que a cura terapêutica de animais cronicamente infectados possa ser alcançada mediante o tratamento por longos esquemas de tratamento com benzonidazol (BUSTAMANTE, BIXBY & TARLETON, 2008). Por outro lado, nifurtimox e benzonidazol apresentam sérias limitações principalmente relacionadas à toxicidade e aos variáveis resultados de acordo com a fase da doença, a duração do tratamento, a idade dos pacientes e a área geográfica (COURA, 2007). De fato, foram relatados diferentes perfis de suscetibilidade aos nitrofuranos entre cepas de *T. cruzi* (BRENER & CHIARI, 1967; BRENER, COSTA & CHIARI, 1976).

### 4.6.1 Nifurtimox

Todas as três formas evolutivas do *T. cruzi* são sensíveis ao nifurtimox [4-(5-nitro-furilidenoamino-) tetrahydro-4-4-1, 4-tiazina-1-1dióxido], desde os tripomastigotas sanguíneos até aos amastigotas teciduais. O fármaco é reduzido por nitrorredutases a um radical nitroânion, que reage com o oxigênio molecular ( $O_2$ ) para formar ânions superóxido ( $O_2^-$ ) e regenerando o grupo  $NO_2$  num processo conhecido como ciclo redox. O ( $O_2^-$ ) é

rapidamente catalisados a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela superóxido-dismutase (Figura 15) (RAETHER & HÄNEL, 2003; DIAS, 2009). O acúmulo desta última molécula pode gerar radicais hidroxilas, uma espécie altamente tóxica para o protozoário, uma vez que estes possuem uma maquinaria parcialmente deficiente, principalmente a forma amastigota, para o mecanismo de detoxificação deste intermediário (URBINA & DOCAMPO, 2003).

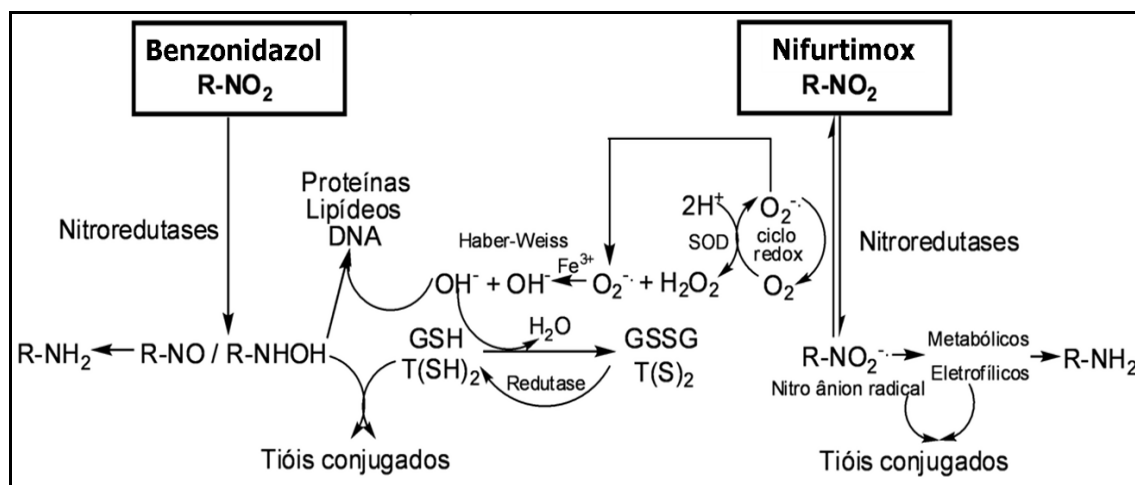
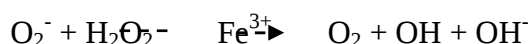


Figura 15 – Mecanismo de ação de nifurtimox e benzonidazol (MAYA, 2007)

Todos os radicais livres produzidos têm ação citotóxica por interagirem com lipídios, proteínas e DNA, levando ao dano de componentes estruturais da célula, como as membranas e o material genético. Ao que parecem, alguns efeitos adversos em mamíferos são derivados da toxicidade pelo excesso de radicais livres formados. Outros intermediários reativos não relacionados a radicais livres também podem ser gerados e causar danos similares as células. O nifurtimox também pode servir como um substrato para a triponotiona-redutase, a principal enzima responsável por reações de oxidorredução do protozoário (BOUTEILLE, 2003).

Os efeitos adversos do nifurtimox (Figura 16) estão provavelmente relacionados com a inespecificidade de sua ação, ou seja, os mecanismos moleculares responsáveis pela atividade tripanocida atingem também a célula do hospedeiro. Embora muitos efeitos sejam

semelhantes aos do benzonidazol, eles aparecem com maior intensidade (BRASIL, 2004). Foram descritos mialgia e parestesia derivadas de polineurite periférica, distúrbios gastrintestinais, perda de peso, fraqueza, reações de hipersensibilidades entre outras (RAETHER & HÄNEL, 2003).

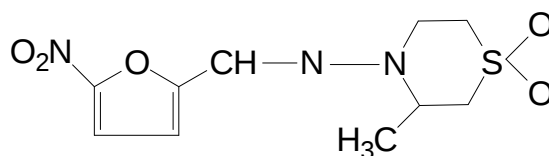


Figura 16 – Estrutura química do nifurtimox

#### 4.6.2 Benzonidazol

Ao contrário do nifurtimox, o benzonidazol [N-(benzil-2-nitro-imidazolacetamida)] (Figura 17) não estimula a produção de  $O_2$  e  $H_2O_2$  nas mesmas condições experimentais, mas ainda assim, inibe o crescimento do *T. cruzi in vitro*, através da enzima NADH-fumarato redutase o que indica que o efeito tripanocida do benzonidazol não depende da produção de espécies reativas de oxigênio (TAVARES, 2006). Estudos comprovam que este fármaco aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama ( $IFN-\gamma$ ). Possivelmente, ocorre a geração *in situ* de metabólitos ativos nitrorreduzidos do benzonidazol. O grupo nitro ( $NO_2$ ) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino ( $NH_2$ ) pela ação de enzimas nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares  $R-NO_2$  (Figura 15). Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro ( $R-NO_2^-$ ) com subsequente formação de hidroxilamina ( $R-NHOH$ ), aldeído-oxidase e outras enzimas do sistema citocromo P450, os quais são capazes de se ligar covalentemente a proteínas e lipídios, tanto do parasito quanto do hospedeiro (DIAS, 2009).

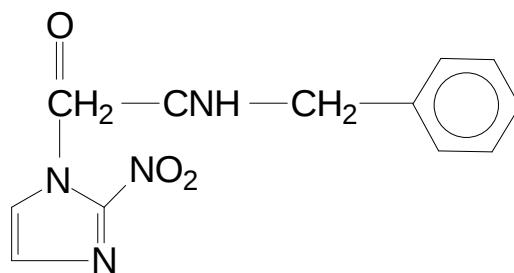


Figura 17 – Estrutura química do benzonidazol

Como consequência dos danos redutores nos tecidos do hospedeiro, o fármaco apresenta efeitos adversos significativos, os quais podem, em alguns casos, levar à necessidade de interrupção do tratamento. As dermatopias por hipersensibilidade são mais frequentes, aparecendo logo após a primeira semana (BRASIL, 2004).

A questão da toxicidade dos nitroderivados pode ser resumida a partir de informação abundante na literatura científica. Os compostos aromáticos e heteroaromáticos que possuem o grupo nitro são considerados poluidores do meio ambiente pela comprovada mutagenicidade e cancerogenicidade. Alguns desses compostos têm sido usados como defensivos agrícolas e outros têm sido amplamente usados como fármacos. As propriedades mutagênicas e cancerígenas são liberadas pela ação de nitrorredutases e transesterificases durante a metabolização da droga. As ações metabólicas modificam a estruturas químicas desses compostos, ativando-os, sendo a potência carcinogênica dos 2-nitroimidazólicos mais fortes que a dos 5-nitrofuranos. Isso se explica porque o 2-nitro é mais susceptível à redução pela enzima microsomal. Em adição, a redução do grupo nitro associa-se com alteração do número de elétrons nos últimos orbitais, aumentando seu potencial mutagênico; os radicais instáveis produzem adutos que modificam a fase das fitas do DNA (TEIXEIRA, 2007).

Ambos os nitroderivados apresentam eficácia na fase aguda e crônica recente da doença, alcançando níveis de até 80% de cura nas doses de 8 a 10mg/kg/dia com nifurtimox e de 5 a 7,5mg/kg/dia com benzonidazol, durante sessenta a noventa dias de terapia. No entanto, na fase crônica, ambas as drogas alcançam somente de 10 a 20%, de acordo com as áreas geográficas (COURA & DE CASTRO, 2002; CANÇADO, 2002), o que, somando a resistência natural observada em vários isolados do parasito, reforça a necessidade de identificar novos compostos que possam vir a substituí-los (SOEIRO & DE CASTRO, 2009).

#### **4.7 PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS**

Nos últimos anos o estudo da quimioterapia da doença de Chagas tem sido intenso, porém as indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos contra esta doença, por serem esses programas caros, especulativos e longos, não sendo, assim, justificado em uma base puramente comercial (SOEIRO, 2009; CARVALHEIRO, 2009).

Para o desenvolvimento de novas drogas é necessária a descoberta de uma estrutura química líder (scaffold), com a atividade biológica desejada, e o desenvolvimento dessa estrutura em uma forma segura e terapeuticamente efetiva. Com o avanço da tecnologia é possível dispor de métodos mais específicos, tais como a triagem randômica, triagem direcionada e a descoberta racional, que possibilitam a descoberta de um scaffold.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e seus colaboradores definiram um perfil para o desenvolvimento de novos medicamentos, que inclui dois elementos fundamentais: eficácia na administração por via oral na fase indeterminada e crônica da doença e tratamento completo realizado no período de 60 dias. Considerando que os atuais regimes de tratamento experimental para benzonidazol e nifurtimox são 60-120 dias (COURA & DE CASTRO, 2002). Várias instituições públicas e privadas vêm atrelando esforços para descobrir e desenvolver novos fármacos para a Doença de Chagas (Tabela 1).

Tabela 1 - Universidades, instituições e organizações que promovem investigações científicas para a quimioterapia da doença de Chagas (Adaptado de MCKERROW, 2009).

#### **Esforços Dirigidos à Descoberta e Desenvolvimento de Medicamentos para a Doença de Chagas**

|                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------|
| Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi)          |
| Universidade Federal de Alagoas, Brasil                                |
| Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil                           |
| Universidade Federal de Pernambuco, Brasil                             |
| Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil                         |
| FIOCRUZ, Brasil                                                        |
| Instituto de Parasitologia e Biomedicina López-Neyra, Espanha          |
| Instituto Militar de Engenharia, Brasil                                |
| Instituto Nacional de Parasitologia Dr. Mario Fatała Chabén, Argentina |
| Instituto Venezuelano de Investigações Científicas, Venezuela          |
| Sandler Center, Mission Bay, Estados Unidos                            |
| Universidade Autónoma de Yucatán, México                               |
| Universidade de Buenos Aires, Argentina                                |
| Universidade de la República, Uruguai                                  |
| Universidade Nacional de Córdoba, Argentina                            |
| Universidade Nacional de Rosario, Argentina                            |
| Universidade do Chile, Chile                                           |
| Universidade de Cincinnati, Estados Unidos                             |
| Universidade de Dundee, Reino Unido                                    |
| Universidade de São Paulo, Brasil                                      |
| Universidade de Washington, Estados Unidos                             |
| Organização Mundial de Saúde (WHO)                                     |

A pesquisa científica tem identificado e caracterizado alvos específicos para o desenvolvimento e a ação de potenciais fármacos para tratar a doença de Chagas. Uma etapa crucial do ciclo biológico desse protozoário no hospedeiro vertebrado é sua entrada na célula mamífera (SOEIRO, 2009; CARVALHEIRO, 2009).

A inibição de enzimas-chaves do catabolismo de açúcares, da síntese de lipídeos, da digestão de proteínas internalizadas do hospedeiro e da via de salvação de purinas poderia resultar em interrupção do crescimento do parasito (TEIXEIRA, 2007).

#### **4.7.1 Cruzipaína**

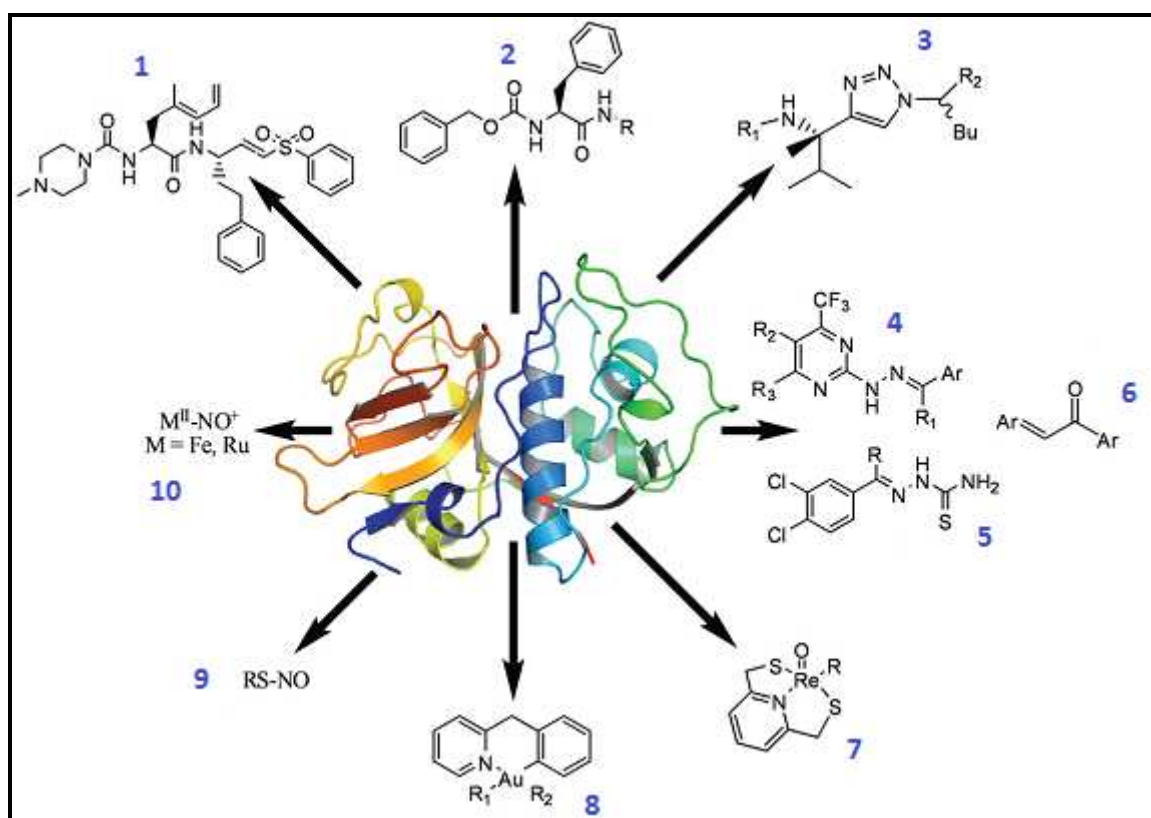
A importância da atividade da cruzipaína para o ciclo de vida do *T. cruzi* tornou esta enzima um dos alvos de drogas mais estudados nos parasitos. A cruzipaína também conhecida como GP57/51 ou cruzaina (Figura 18) é considerada uma das proteínas mais abundante do *T. cruzi*, apresenta ampla especificidade catalítica, uma vez que hidrolisa várias proteínas não relacionadas. Essa característica enzimática, associada a localização lisossômica relaciona a cruzipaína ao processo de nutrição do parasito por meio de hidrólise de proteínas e peptídeos (SCHARFSTEIN, 2000).

O tratamento de epimastigotas com inibidores de cisteíno-proteases (Tabela 2), derivados da classe vinil sulfonas, resultou em acúmulos da cruzipaína não processada nos compartimentos vesiculares provocando anormalidades no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático. Consequentemente foi observada uma interrupção no tráfego de proteínas e morte do parasito após 48 horas de tratamento (TODOROV, 2003).

Tabela 2: Principais inibidores de cruzapaína (Adaptado de DIAS, 2009).

| Principais Classes de Inibidores de Cruzapaína                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Derivados peptídicos <sup>[1,2]</sup>                                                                    |
| Derivados não-peptídicos<br>(triazóis, pirimidinas, tiossemicarbazonas e chalconas) <sup>[3,4,5,6]</sup> |
| Complexo de rutênio e ouro<br>(oxorênios e ciclometalados de ouro) <sup>[7,8]</sup>                      |
| Doadores de óxido nítrico<br>(nitrosotióis e nitrosilo complexos de ferro e rutênio) <sup>[9,10]</sup>   |

[1,2,3,4,5,6,7,8,9,e 10] – São inibidores da enzima cruzapaína (figura 18)

Figura 18 - Estrutura cristalográfica da cruzapaína de *T. cruzi*. e inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas (DIAS, 2009).

#### 4.7.2 Catepsina B

Sintetizada como uma pré-pró-enzima, a catepsina B é uma cisteíno-protease de 30KDa expressa nas três formas do parasita, localizada nos lisossomos. Sua relevância na nutrição do parasita pode ser sugerida pela hidrólise de substrato não relacionados, tais como BSA, colágeno tipo I, gelatina, fibrinogênio e IgG desnaturada. Além do seu envolvimento na nutrição ou como consequência deste, a catepsina B também está relacionada com a diferenciação do parasito. Isso foi observado por meio da superexpressão do seu gene em epimastigotas, o que promoveu um incremento na taxa de replicação e metaciclogênese do parasito. Tal processo parece dependente da ação da catepsina B na renovação de proteínas celulares, que ocorre intensamente durante a metaciclogênese ou, por contribuir para a produção de aminoácidos livres, fundamentais para o metabolismo energético do parasito (BASTOS, 2004).

#### 4.7.3 Prolil oligopeptidase

Uma característica essencial do ciclo de vida do *T. cruzi* em células hospedeiras é sua habilidade de infectar e replicar-se no interior de vários tipos celulares. O sucesso da infecção pelo parasito vai depender, em um primeiro momento, da sua capacidade em migrar através da matriz extracelular (ME), e assim ter acesso à superfície da célula hospedeira. Para que isso ocorra, o parasito dispõe de proteases que hidrolisam proteínas, como colágeno, fibronectina e laminina. Uma das proteases candidata a esse processo é a propil oligopeptidase de *T. cruzi* (POP Tc80) que hidrolisa colágenos dos tipos I e IV e fibronectina em vários sítios de clivagem. Essa atividade collagenolítica foi demonstrada *in situ* sobre mesentério de rato, tecido rico em colágeno do tipo I; é comparável à collagenase de *Clostridium*, bactéria altamente invasiva (BASTOS, 2004).

O envolvimento da POP Tc80 no processo de infecção do parasito foi esclarecido pelo uso de inibidores seletivos, uma vez que a taxa de inibição da POP humana é sessenta vezes menor que a da POP Tc80. Essas moléculas inibem, *in vitro*, a entrada de formas tripomastigotas em diferentes tipos de células não fagocíticas, com IC<sub>50</sub> variando entre 10 a 20 µM. É importante citar que esse bloqueio da invasão não foi resultado de um efeito citotóxico desses inibidores, visto que sob as doses utilizadas no estudo não houve alteração na mobilidade do parasito ou na proliferação das células hospedeiras. Tampouco foi

decorrente da inibição da ancoragem do parasito á membrana celular. O bloqueio da entrada do tripomastigota na célula foi um processo ativo mediado por transdução de sinais, que resulta no recrutamento e na fusão de lisossomos da célula hospedeira no sítio de ligação do parasito (GRELLIER, 2001).

#### 4.7.4 Oligopeptidase B

Além do envolvimento de proteínas de superfície e moléculas sinalizadoras clássicas, como o sistema de quinases-fosfatases, o parasito dispõe de outra protease chave para garantir sua entrada na célula mamífera, a oligopeptidase B (OpB) (BURLEIGH, 1995). Sua participação na invasão celular ocorre por meio da geração de um agonista que ativa fosolipases C da célula hospedeira resultando na formação de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e, consequentemente, na liberação da Ca<sup>2+</sup> intracelular (RODRIGUEZ, 1995). Ainda não é possível afirmar se a produção do agonista ocorre no citoplasma ou no meio extracelular pela OpB secretada. No entanto, a liberação de Ca<sup>2+</sup>, resulta em modificação do citoesqueleto, que promove recrutamento e fusão de lisossomos da célula hospedeira no local de ligação do parasito, facilitando sua entrada. Ao contrário de muitos patógenos intracelulares que evitam a fusão com os lisossomos, o *T. cruzi* depende de presença dessa organela para sobreviver, uma vez que seu ambiente acídico ativa processos fisiológicos essenciais que resultam na diferenciação de tripomastigotas em amastigotas (YOSHIDA, 2009).

#### 4.7.5 Aminopeptidases

Essas exopeptidases estão envolvidas em diversas funções celulares, tais como a maturação e a renovação protéicas, a hidrólise de peptídeos reguladores hormonais ou não, a modulação da expressão gênica (GAVIGAN, 2001). Em cooperação com endopeptidases, as aminopeptidases hidrolisam proteínas e peptídeos em aminoácidos livres. Essas metaloproteases vêm sendo consideradas alvos importantes para a produção de fármacos por causa da relevância no ciclo de vida de diversos patógenos, como *Plasmodium spp.*, *T. brucei* e *Leishmania spp* (MORTY, 2002). Além disso, as aminopeptidases participam da clivagem de peptídeos produzidos pelo proteossoma para a apresentação de antígenos classe I induzida pelo IFN- $\gamma$  (GARDINER, 2006).

#### 4.7.6 Inibidores da Biossíntese de Esteróis

Os inibidores da biossíntese de esteróis (IBE) ainda são considerados as principais promessas no campo dos quimioterápicos contra a doença de Chagas. Os lipídeos são moléculas essenciais para a viabilidade dos organismos uma vez que desempenham diversos papéis biológicos, como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, hormônios, mensageiros intracelulares, além de serem grande fonte de energia (URBINA, 2002). O principal esterol do *T. cruzi* é o ergosterol, essencial para a viabilidade e a proliferação do parasito, já que esses patógenos não utilizam o colesterol presente em abundância na célula hospedeira. Já nos mamíferos bem como em outros animais o seu correspondente é o colesterol. Essa diferença metabólica entre o parasito e o hospedeiro vem despertando a atenção de grupos de pesquisas quanto ao emprego de inibidores da biossíntese do ergosterol (Figura 19) na quimioterapia da doença de Chagas (URBINA, 2009). Atualmente, as enzimas mais bem estudadas da biossíntese de ergosterol são a esterol 14-demetilase, lanosterol sintase, esqualeno epoxidase, esqualeno sintase, esterol metiltransferase, farnesilpirofosfato sintase e a farnesiltransferase (Figura 19).

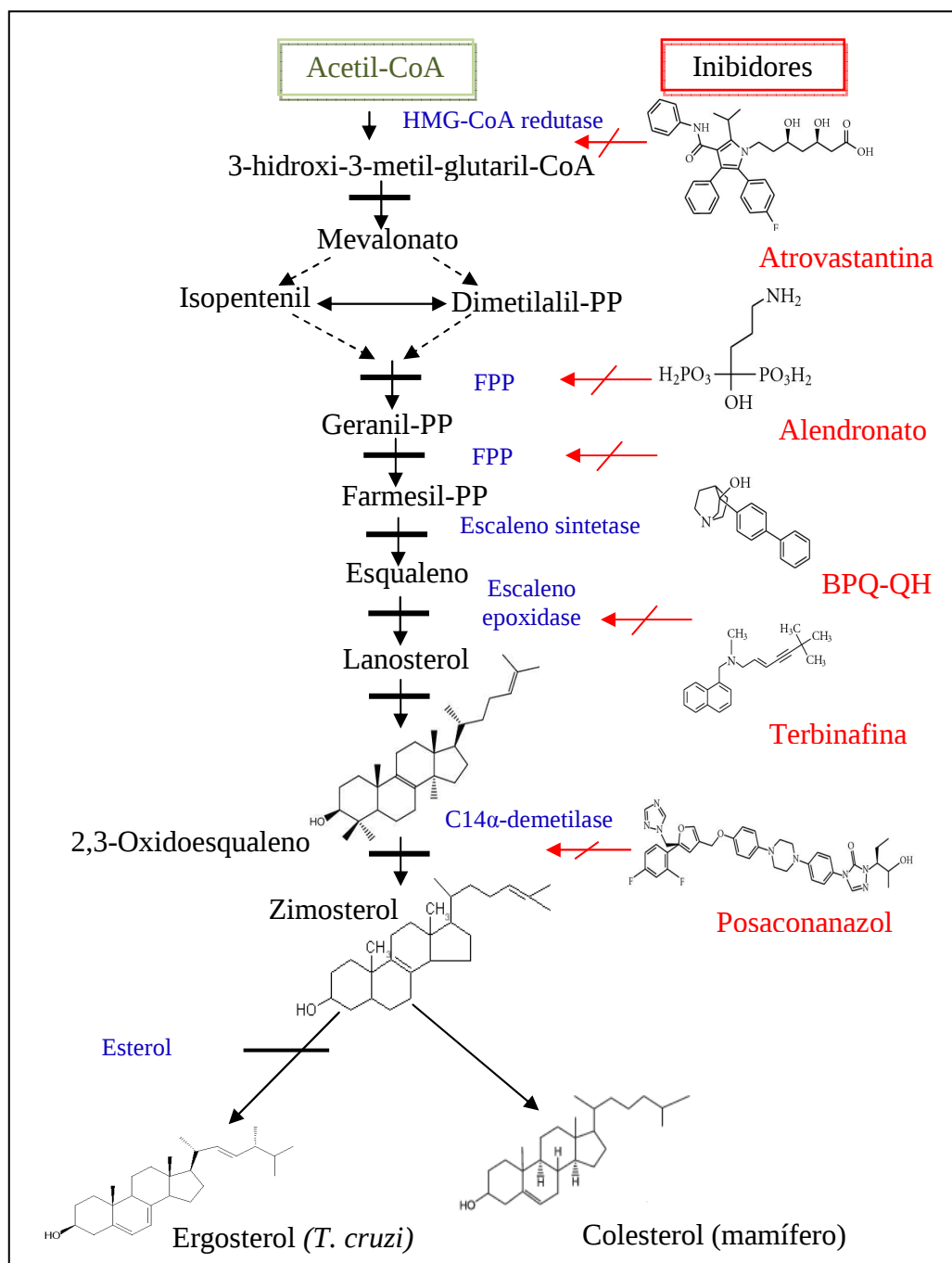


Figura 19 - Biossíntese do ergosterol e colesterol (Adaptado de DE SOUZA, 2009)

Em particular, a biossíntese do ergosterol foi quimicamente validada *in vitro*. No entanto, vários estudos têm demonstrado que IBE disponíveis comercialmente, como itraconazol (Figura 20) e cetoconazol (Figura 21), eficazes no tratamento de doenças micóticas, não foram eficientes o bastante para eliminar o parasito tanto em modelos experimentais como em humanos (URBINA & DOCAMPO 2003).

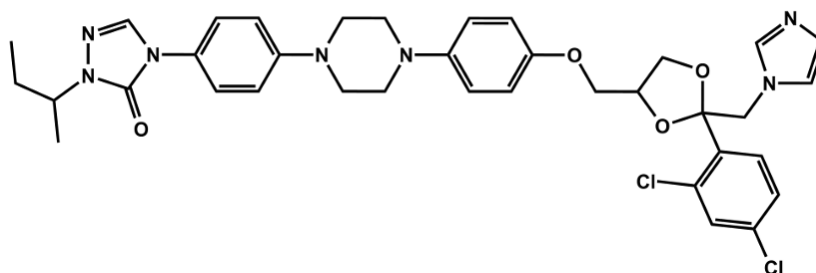


Figura 20 - Estrutura química do itraconazol (URBINA & DOCAMPO 2003)

Por outro lado o cetoconazol quando complexado com rutênio, cobre, ouro e platina, apresenta um aumento significativo da atividade antiproliferativa contra a forma epimastigotas do *T. cruzi*, com inibição em torno de 1  $\mu$ M. Isso provavelmente ocorre pela ligação típica entre o cloro e água, ativando os complexos por modificação covalente (MOREIRA, 2009).

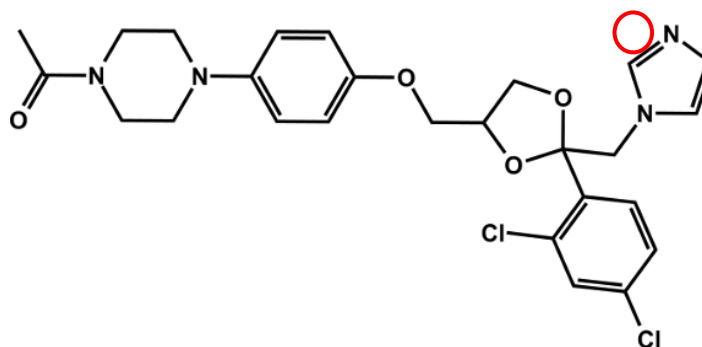


Figura 21 - Estrutura química do cetoconazol (MOREIRA, 2009).

No entanto, novas moléculas derivadas triazóis, por exemplo, D0870 e posaconazol, que são inibidores potentes e seletivos de fungos e protozoários dependentes de citocromo P450, estão sendo desenvolvidas, apresentando resultados promissores por induzir a cura parasitológica em modelos murinos, tanto na fase aguda quanto crônica da doença de Chagas (HANKINS, 2005). Os inibidores D0870 (Figura 22) e posaconazol (Figura 23) são capazes também de erradicar formas de *T. cruzi* resistentes a nitrofurano e nitoimidazólicos de camundongos infectados, mesmo quando estes são imunossuprimidos. Esses inibidores têm alvos a esterol C14 $\alpha$ - demetilase e apresentam propriedades farmacocinéticas vantajosas,

como meias-vidas variando de 25 a 120 horas e extenso volume de distribuição nos tecidos (URBINA, 2009).

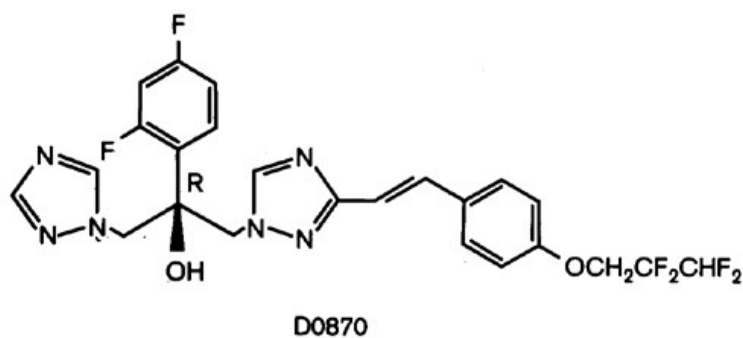


Figura 22: Estrutura química do D0870 (URBINA, 2009)

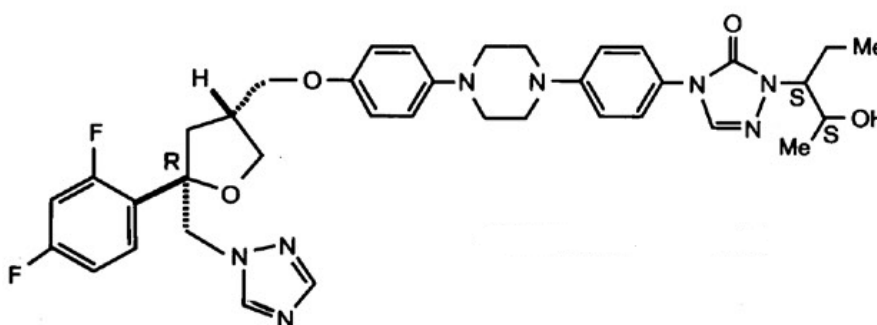


Figura 23: Estrutura química do posaconazol (URBINA, 2009)

#### 4.7.7 Poliaminas e Via de salvação de purinas

As poliaminas são moléculas positivamente carregadas, que desempenham função crucial nos processos de divisão e diferenciação celular, atuam como cofatores para a síntese de macromoléculas e como estabilizadores conformacionais de ácidos nucléicos. Em razão de suas importantes funções, a via de síntese de poliaminas (Figura 24) é um contínuo objeto de estudo em tumores e parasitos visando ao desenvolvimento de novos medicamentos. A principal diferença no metabolismo das poliaminas entre tripanossomatídeos e mamíferos está na meia-vida das enzimas, ornitina descarboxilase e S-adenosilmetionina descarboxilase,

sendo o período de meia-vida curto no mamífero e longo nos tripanossomatídeos (BACCHI, 2001).

Outro fator a ser considerado é que a síntese de poliaminas está intimamente associada a via de salvação de purinas (Figura 24), que constitui outro alvo potencial para a ação de fármacos. Uma enzima que está envolvida na via de salvação de purinas é a metiltioadenosina fosforilase (MTAF). Essa proteína cliva a metiltionadenosina (MTA), subproduto da síntese de poliaminas, em metiltioribose-1-fosfato (MTR-1P) e adenina, sendo a última disponível para a célula. Além disso, o fato de a enzima dos mamíferos apresentar uma alta especificidade pela (MTA), não clivando seu análogos, permite maior seletividade contra os tripanossomos (BERRIMAN, 2005).

Por causa da sobreposição das vias de síntese de poliaminas e da via de salvação das purinas, a inibição da primeira causaria também o bloqueio da síntese de MTA e, subsequentemente, aumentaria a utilização e a toxicidade de substratos subversivos da MTAF. Logo, a combinação de ambas as estratégias poderia acarretar um efeito sinérgico contra os parasitos (EL KOUMI, 2003).

#### **4.7.8 Balanço redutor/oxidativo**

A tripanotiona é a poliamina responsável pela proteção dos parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* contra radicais livres e pela manutenção de ambientes intracelulares reduzidos. A via de redução da tripanotiona oxidada (Figura 24) para a forma reduzida é mediada pela tripanotiona redutase (TR). Considera-se essa via um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos em decorrência de sua ausência em células de mamíferos (AGUIERRE, 2004).

A TR de *T. cruzi* tem sua estrutura tridimensional identificada, o que possibilita uma análise virtual do potencial inibitório dos compostos comercialmente disponível. Essa abordagem resultou na identificação da cloro-hexidina como eficiente inibidor da enzima desse organismo (BI, 2006).

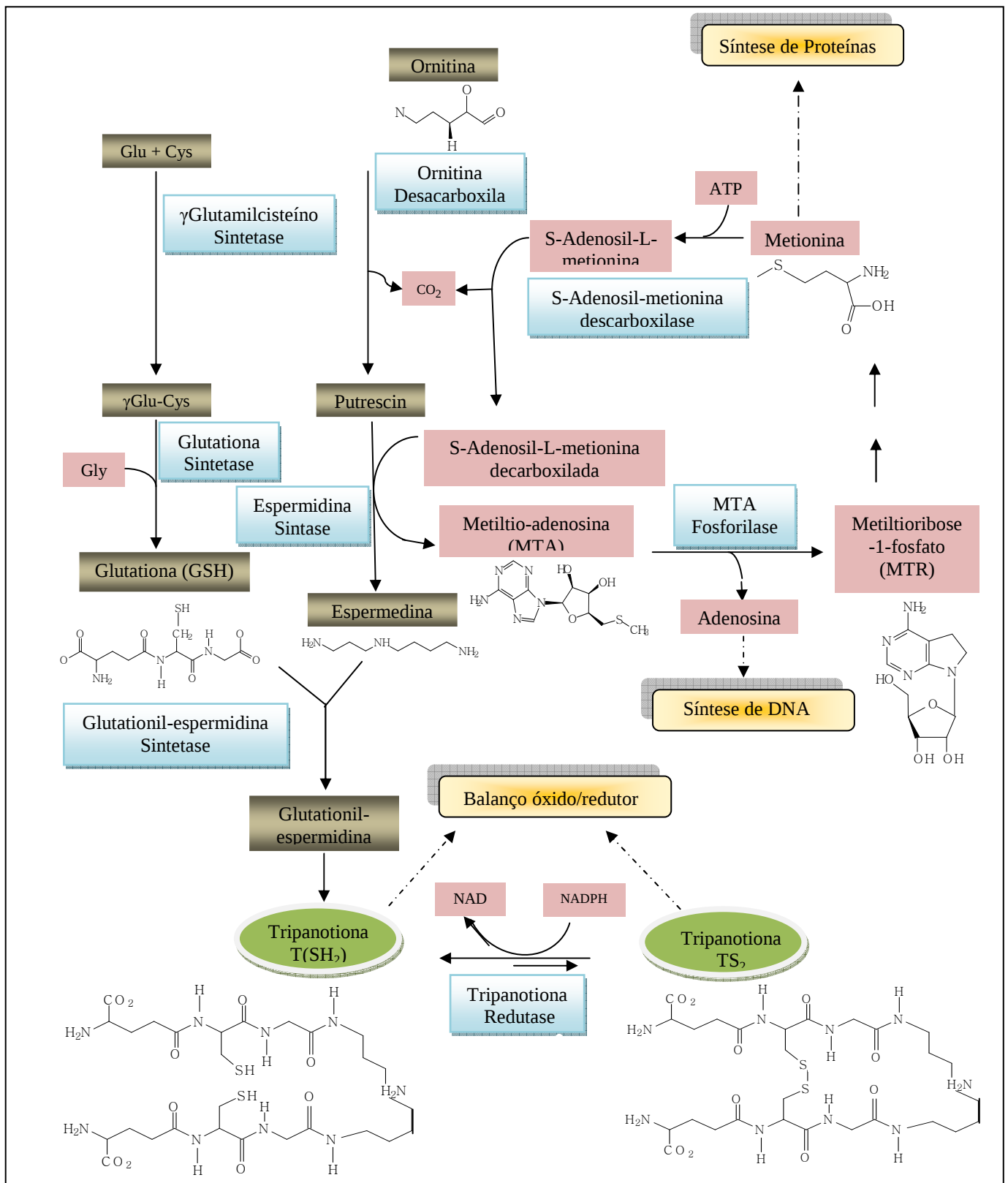


Figura 24 - As vias de síntese de poliaminas do balanço oxi-redutor e de salvaguarda de purinas são integradas e interdependentes no *T. cruzi* (Adaptado de TEIXEIRA, 2007).

#### 4.7.9 Metabolismo de açúcares

Os cinetoplastídeos *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp são altamente dependentes da via glicolítica para suprir sua necessidade de energia. As enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), fosfoglicose isomerase (PGI), frutose difosfato aldose (ALDO), glicerolquinase (GK), trifosfato isomerase (TM), glicerol-3-fosfato desidrogenase (GDH), 3-fosfoglicerato quinase (PGK), que compõem a glicólise e a via pentose fosfato localizam-se em uma organela chamada glicossoma. Essa compartimentalização não é observada em mamífero, o que resulta em regulação diferenciada do fluxo de substratos e produtos. A via pentose fosfato emprega açúcares como substrato para sintetizar D-ribose-5-fosfato, o qual é importante para síntese de DNA e NADPH, uma molécula essencial na defesa contra estresse oxidativo (CORDEIRO, 2004; DIAS, 2009).

As enzimas dessas duas importantes vias metabólicas de cinetoplastídeos possuem propriedades cinéticas e estruturais que as diferem das enzimas correspondentes nos mamíferos. Esse cenário faz do glicossoma um alvo quimioterapêutico potencial. A ausência de atividade de enzimas localizadas no glicossoma levaria esses parasitos à escassez de energia e ao descontrole do balanço óxido-redutor. Recentemente, a resolução da estrutura tridimensional da glucose-6-fosfato isomerase (GFI) de *L. mexicana*, uma enzima que liga a glicólise à via pentose fosfato, revelou propriedades moleculares únicas, que poderiam ser exploradas visando ao desenvolvimento de inibidores (CORDEIRO, 2004).

A GAPDH é uma enzima tetramérica que catalisa a conversão do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, na presença do cofator  $\text{NAD}^+$  e fosfato inorgânico (Figura 25). A hexoquinase cliva adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP), enquanto que a fosfofrutoquinase catalisa a transferência irreversível de um fosfato de ATP a frutose-6-fosfato (DIAS, 2009).

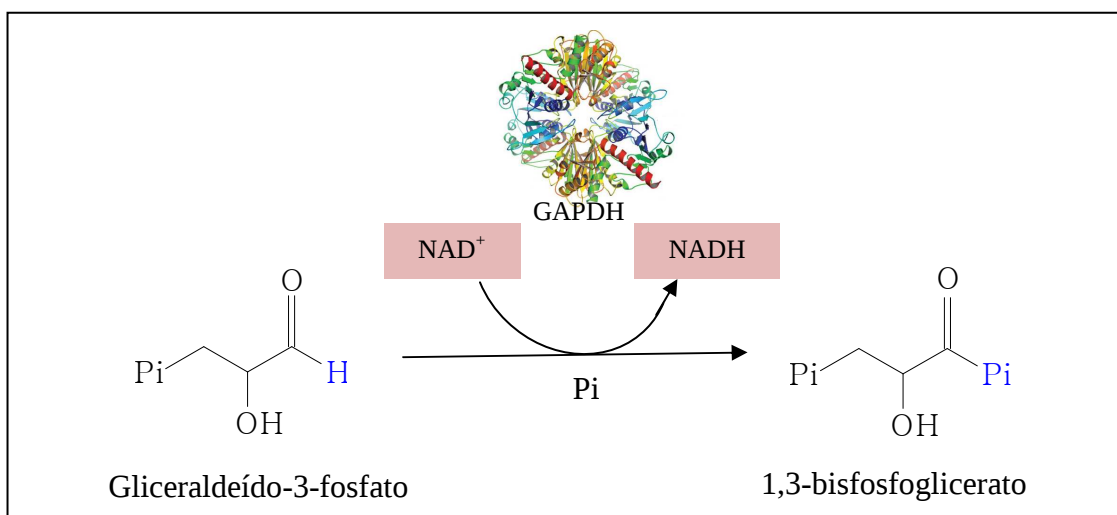


Figura 25 - Reação de conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, catalisada pela enzima GAPDH.

Diversos inibidores de origem natural e sintética, com boa diversidade química, têm sido descobertos para bloquear a ação da enzima GAPDH. Entre eles, merece destaque as cumarinas (A), flavonoides (B) e ácidos anacárdicos (C) de origem natural (Figura 26); os compostos sintéticos derivados de planejamento racional como os nucleosídeos; os reativos intermediários de nitrogênio (óxido nítrico, nitroxil e peroxinirito); e complexos doadores de NO (DIAS, 2009).

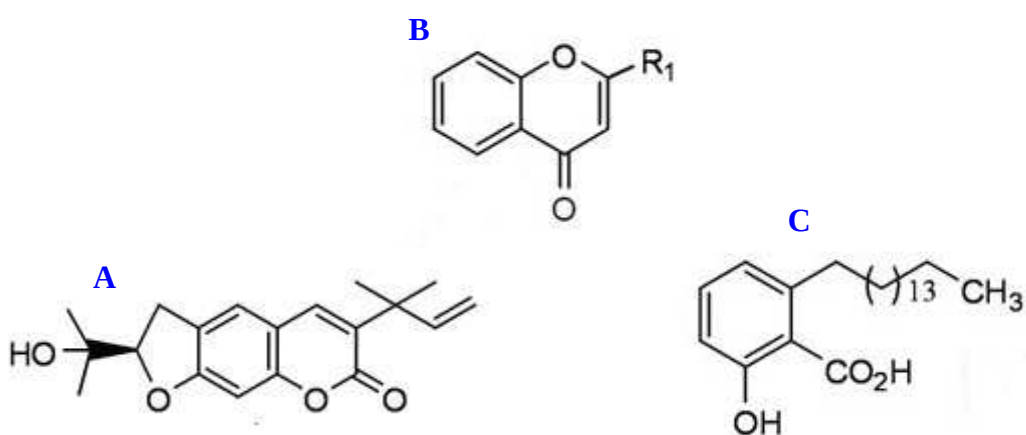


Figura 26 - inibidores de origem natural da enzima GAPDH. (A) cumarina; (B) flavonóides; (C) ácido anacárdicos (DIAS, 2009)

Outro ponto interessante no catabolismo de glicose é aquele catalisado pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (FPC) que converte reversivelmente a descarboxilação e a fosforilação reversível de oxalacetato produzindo fosfoenolpiruvato. Esse parece ser um importante mecanismo de ligação do metabolismo da glicose ao de aminoácidos. A inibição dessa enzima poderia resultar em perda da flexibilidade dos cinetoplastídeos em utilizarem açúcares e aminoácidos como fonte de energia (TRAPANI, 2001).

#### **4.7.10 Transferência de ácido siálico**

Os ácidos siálicos presentes em glicoproteínas e glicolipídeos estão envolvidos em funções biológicas como nos processos de reconhecimento celular; na meia vida de células e proteínas plasmáticas; na modulação do sistema imune; e apoptose. Os ácidos siálicos são ligantes para moléculas de adesão como selectinas ou sialoadesinas, mediando adesão celular ou transdução de sinais, podendo ainda ter um papel importante na interação parasito-hospedeiro (FATIMA, 2005; FIOCRUZ, 2007).

O *T. cruzi*, apresenta uma enzima regulatória de superfície, denominada trans-sialidase (TS), envolvida nas interações entre célula do hospedeiro e parasita. O *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e, através da trans-sialidase, o parasita torna-se apto a transferi-lo de glicoconjugados do hospedeiro e incorporá-lo a moléculas de mucina ligadas à membrana parasitária através de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 27). A enzima trans-sialidase é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico, originando ligações  $\alpha$ -2,3 com unidades de  $\beta$ -galactoseceptoras de moléculas de mucina na superfície do parasita (CAMPO, 2008).

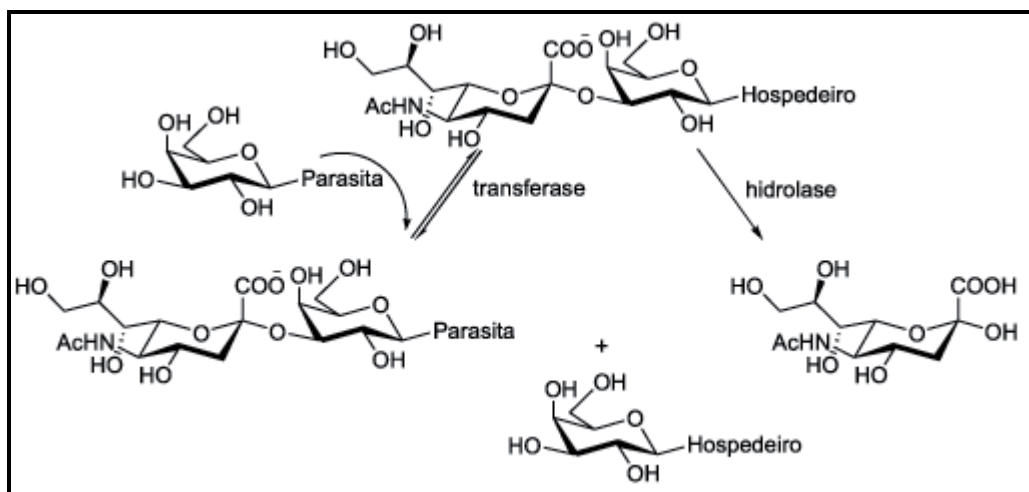


Figura 27 - Transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasito pela ação da enzima trans-sialidase (CAMPO, 2008).

#### 4.7.11 DNA topoisomerase

As enzimas DNA topoisomerase I e II atuam diretamente no processo de replicação do parasito, mas especificamente na cadeia de minicírculos e maxicírculos do DNA do Kinetoplasto (kDNA). Devido à importância da DNA topoisomerase, o desenvolvimento de inibidores é alvo de intensa pesquisa para o planejamento de novos quimioterápicos. Entre os inibidores podemos descartar alguns fármacos antineoplásicos disponíveis comercialmente, tais como os inibidores da topoisomerase I, irinotecano e topotecana; e os inibidores da topoisomerase II, etoposida e teniposida (Figura 28). Diversos estudos têm demonstrado que as acridinas atuam como boas candidatas a inibidores, isso ocorre porque elas ligam-se ao DNA devido a sua capacidade de intercalação (DIAS, 2009).

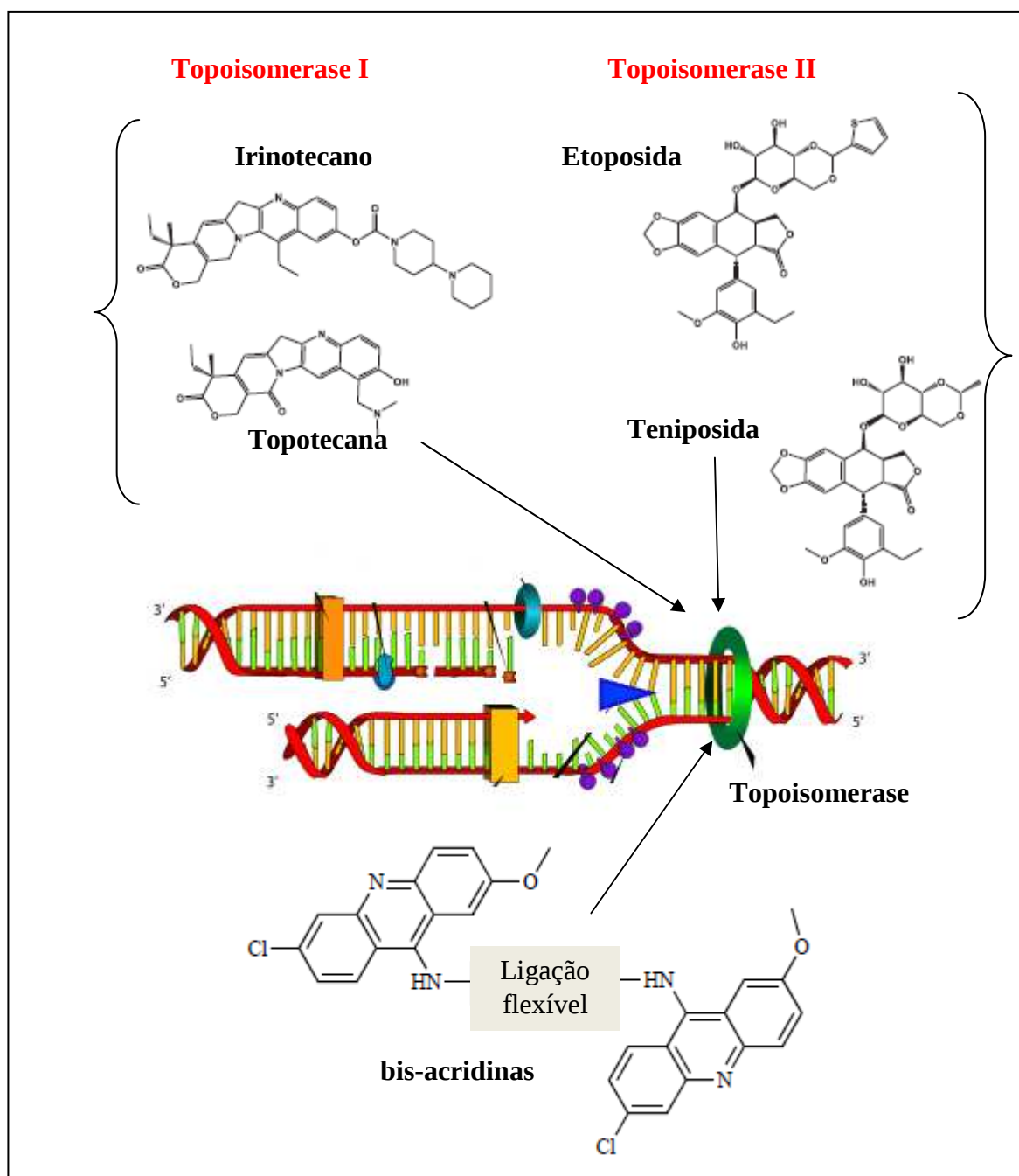


Figura 28 - Inibidores de DNA topoisomerase (Adaptado de DIAS, 2009; MOREIRA, 2009)

#### 4.8 IMIDAZOLIDINAS

As imidazolidina-2,4-diona foram descobertas por Bayer, em 1861, durante pesquisas realizadas com as reações do ácido úrico e corresponde ao 2,4-dicetotetra-hidro-imidazol, embora seja também denominada hidantoínas. A hidantoína é obtida por hidrogenação da alantoína, daí a origem do seu nome. Urech em 1873 sintetizou o derivado 5-metilhidantoína a partir de sulfato de alanina e cianeto de potássio (Figura 29), esta reação é conhecida como a síntese de Urech (OLIVEIRA, 2008).

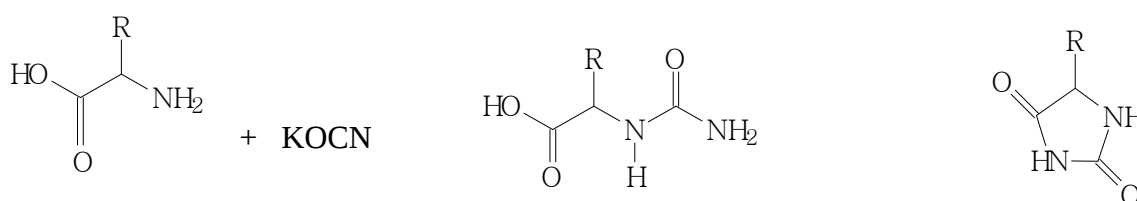


Figura 29 - Obtenção da hidantoína

A primeira fórmula estrutural da hidantoína foi sugerida por Kolbe, em 1870, tendo sido modificada por Strecker, que neste mesmo ano, propôs uma nova fórmula que é aceita até hoje. A partir dessa época, o sistema anelar hidantoínico tem sido intensamente estudado tanto no aspecto químico quanto biológico. Os derivados hidantoínicos destacam-se por apresentarem ação biológica diversificada, entre elas, antimicrobiana, anticonvulsivante e antiparasitária (OLIVEIRA, 2008).

As imidazolidinas são heterociclos pentagonais, formadas por dois átomos de hidrogênio e dois grupamentos carboxílico na posição 2 e 4 do anel (Figura 30). Por apresentar um grupo metil reativo na posição 5 possibilita assim inúmeras sínteses de derivados a partir da condensação com aldeídos aromáticos (WARE, 1950).

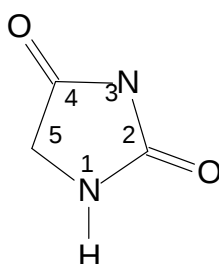


Figura 30 - Fórmula estrutural da imidazolidína

Diretamente associada à estrutura da imidazolidina-2,4-diona, temos a 2-tioxo-imidazolidina-4-ona (Figura 31), sintetizada pela primeira vez em 1890 (KLASON, 1890; *Apud*: EDWARD, 1966). Esta molécula pode ser considerada como bioisótero da imidazolidina-2,4-diona apresentando a mesma reatividade química e atividade biológica comparável. Em 1950, em seu artigo de revisão, Ware observou que os compostos tiocarbonilados e seus derivados eram mais fáceis de ser sintetizados e isolados que os compostos carbonilados. Por sua vez, a reatividade dos compostos tiocarbonilados era maior que os derivados com oxigênio. Em estudo similar com a tio-hidantoínas, Edward em 1966 evidenciou as mudanças produzidas pela substituição do oxigênio por enxofre, principalmente sobre o aumento da polarização do grupo tiocarbonila (WARE, 1950; EDWARD, 1966).

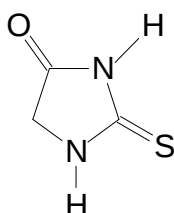


Figura 31 - Fórmula estrutural da 2-tioxo-imidazolidina-4-ona

Algumas reações das imidazolidinas-2,4-diona e das 2-tioxo-imidazolidinas-4-ona podem ser explicadas pela existência das formas tautoméricas destas moléculas. Ware (1950) sugeriu sete diferentes fórmulas (Figura 32) tautoméricas ceto-enólica e amido-imidólica.

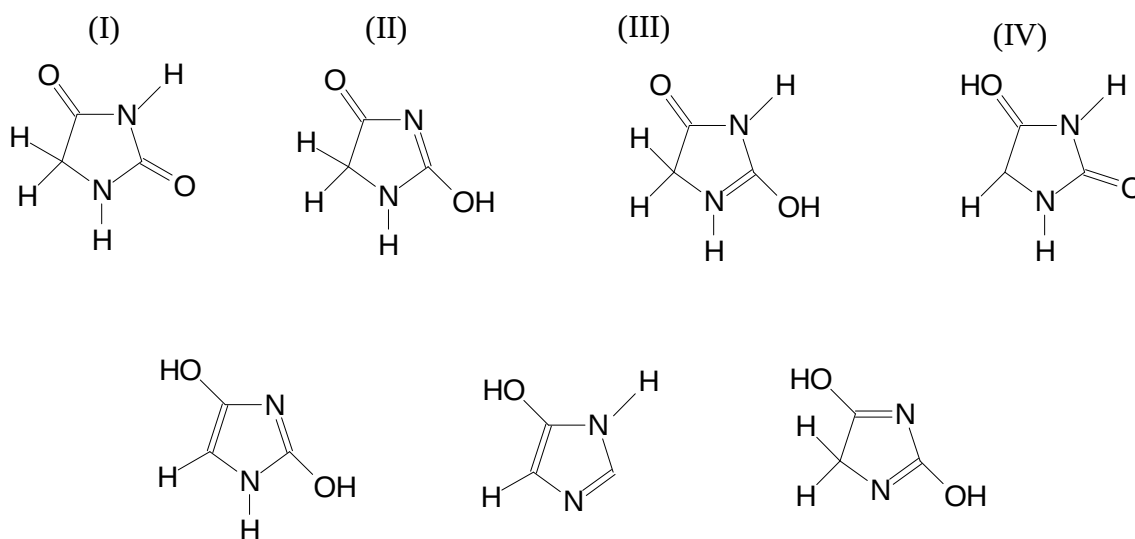


Figura 32 – Formas tautoméricas da imidazolidina-2,4-diona

As imidazolidíνας-2,4-dionas são consideradas ácidos fracos onde a principal contribuição á acidez é devido ao grupamento NH na posição 3, que é influenciada pelos dois grupamentos carboxílicos (eletro-atrator) adjacentes (OLIVEIRA, 2008).

Todos esses efeitos são igualmente observados nas 2-tioxo-imidazolidíνας. Uma vez que o grupamento tiocarbonílico é mais eletro-atrator que o grupamento carbonílico, a 2-tioxo-imidazolidin-4-ona (pka 8,5) é um ácido ligeiramente mais forte que a imidazolidína-2,4-diona (pka 9,12) (LÒPES & TRIGO, 1985).

# Materiais e Métodos

---

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Parte Química

#### Síntese dos Derivados Imidazolidínicos (LPSF/NN)

Para a síntese e a comprovação estrutural dos novos compostos da série LPSF/NN, foram utilizados reagentes específicos (Merck ou Aldrich) e solventes (Vetec ou Quimis):

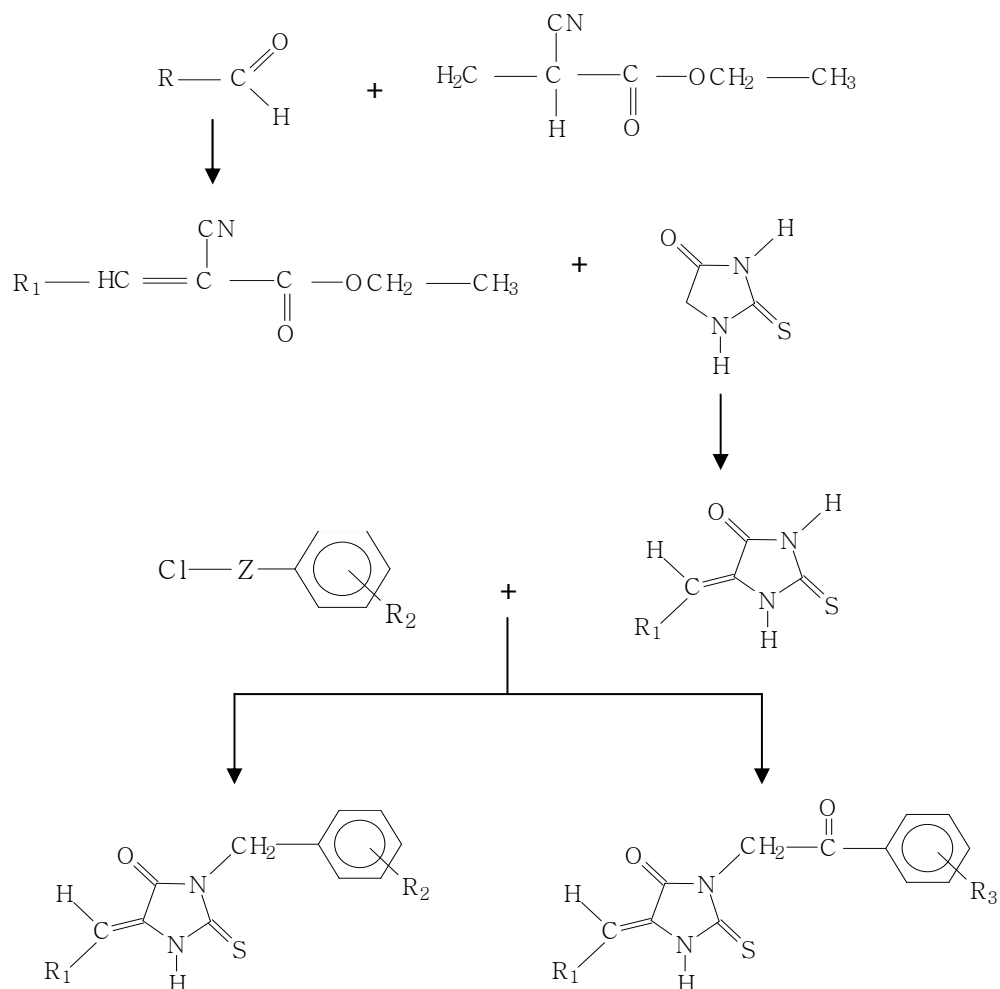
- 2-tioxo-imidazolidin-4-ona, cloreto de 4-cloro-benzil, cloreto de 4-cloro-fenacil, cloreto de 4-fenil-febacil, brometo de 4-bromobenzil, cloreto de 2,4-diclorobenzil, brometo de 4-nitrobenzil, 4-nitrobenzaldeído, 4-metóxi-benzaldeído, indolcarboxaldeído, 2-metóxi-5-bromobenzaldeído, 4-dimetilaminobenzaldeído, 3-flúorbenzaldeído, 3,4-diclorobenzaldeído, 3-bromobenzaldeído, acetato de etila, n-hexano, etanol absoluto, piperidina e tolueno.

Os equipamentos utilizados foram:

- Espectrofotômetro de infravermelho (Modelo IFS 66), FTIR Bruker (pastilha de KBr), espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Modelo Plus, 300MHz varian), aparelho de ponto de fusão Quimis (Modelo 34027), equipamento do massa.

De acordo com a figura 33 os derivados 5-benzilideno-2-tioxo-imidazolidin-4-onas (LPSF/NN) foram obtidos em três etapas. Inicialmente foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Cope e colaboradores (1937, 1941), através de uma condensação do tipo Knoevenagel entre o benzaldeído substituído e o cianoacetato de etila, em uma solução em benzeno anidro tendo como catalisador a piperidina. A segunda etapa ocorreu através de uma reação de adição nucleofílica de Michael, onde se utilizou a 2-tioxo-imidazolidin-4-ona com os derivados 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila, a piperidina como catalisador e o etanol como solvente. Na última etapa, ocorreu a reação de N-alquilação da 5-benzilideno-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN) que reagiu com haletos de alquila substituídos, em soluções alcalinas conduzindo à dos compostos finais 3-benzil-5-benzilideno-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN).

A figura 33 abaixo representa o diagrama de síntese dos derivados imidazolidínicos (LPSF/NN).



|             |                     |               |
|-------------|---------------------|---------------|
| LPSF/NN-20A | $R_1 = 4NO_2$       | $R_2 = 4Cl$   |
| LPSF/NN-25  | $R_1 = 4OCH_3$      | $R_2 = 4Cl$   |
| LPSF/NN-30  | $R_1 = 3indol$      | $R_2 = 4Cl$   |
| LPSF/NN-52  | $R_1 = 3indol$      | $R_2 = 4Br$   |
| LPSF/NN-89  | $R_1 = 2OCH_3, 5Br$ | $R_2 = 4Cl$   |
| LPSF/NN-100 | $R_1 = 3indol$      | $R_2 = 4NO_2$ |
| LPSF/NN-211 | $R_1 = 4N(CH_3)_2$  | $R_2 = 4Br$   |

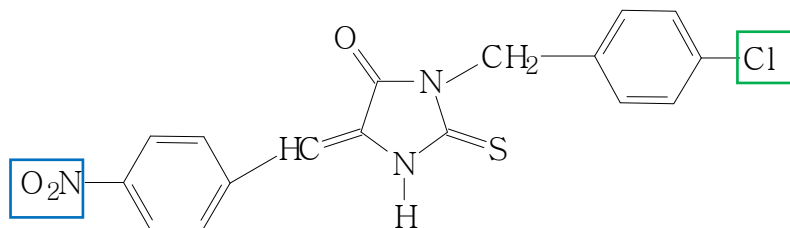
### **Preparação das 2-tioxo-imidazolidin-4-onas substituídas (LPSE/NN)**

Uma mistura equimolar (4,3 mMol) de 2-tioxo-imidazolidin-4-ona (0,5g) e de 2-ciano-3-fenil-acrilato de etila foi dissolvida em 15 ml de etanol absoluto, na presença de 10 gotas de piperidina (catalisador) e aqueceu-se a uma temperatura de 60-80°C durante 2-6 horas. A reação foi acompanhada através de cromatografia em camada delgada (CCD). O precipitado obtido após resfriamento foi lavado com água destilada.

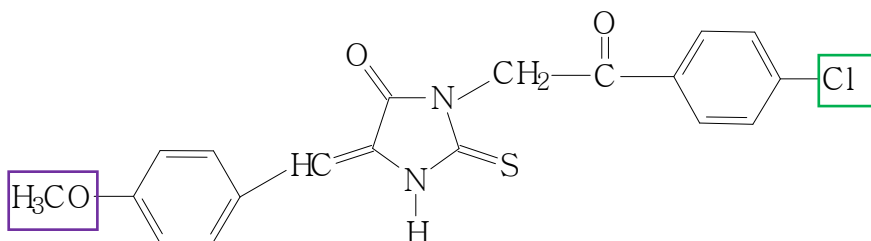
Em uma segunda etapa, 0,40mMol dos derivados 5-benzilidenos-2-tioxo-imidazolidin-4-onas obtidos foram colocados em balão de fundo redondo juntamente com 0,48mMol de carbonato de potássio e 5ml de metanol seco. A mistura foi agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida adicionou-se 0,44mMol de haletos de benzila substituídos. A agitação foi mantida por 12-20 horas. Os produtos finais precipitados foram filtrados e lavados com uma mistura de água/metanol 9:1.

### **Imidazolidíνας Candidatas a Quimioterapia da Doença de Chagas**

As imidazolidíνας e seus derivados são componentes chaves para o desenvolvimento de compostos bioativos para o tratamento da doença de Chagas. De acordo com dados obtidos na literatura podemos comprovar os inúmeros estudos de síntese de novos derivados a partir da imidazolidina.

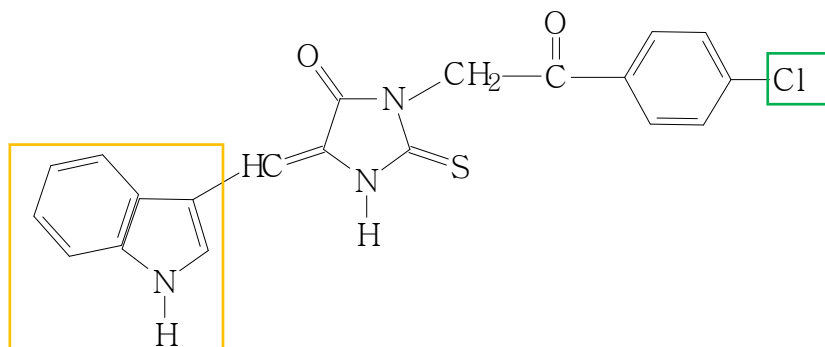
**3-(4-clorobenzil)-5-(4-nitrobenzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-20A)**


Fórmula Molecular:  $C_{17}H_{12}O_3N_3ClS$ ; Massa Molecular: 375,5g/mol; Ponto de Fusão: 241°C; Rendimento: 31%; Razão de Frente e Sistema: 0,53 *n*-Hex/AcOEt 7:3;  $^1H$  RMN (DMSO, 300MHz)  $\delta$ : 4,61 (s, 2H,  $CH_2$ ); 6,85 (s, 1H, CH); 12,08 (s, 1H, NH); 7,42 (d, 2H,  $J = 8,39$ Hz); 7,56(d, 2H,  $J = 8,39$ Hz); 8,29(d, 2H,  $J = 8,99$ Hz); 8,43(d, 2H,  $J = 8,99$  Hz); IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3299 (NH), 1742 (C=O), 1509 (C=C), 1688 (C=S); MS,  $m/z = 373 (M^+)$ ,  $374 (M+H)^+$ ,  $374 (M+H+2)^+$ , 249, 125, 99, 89.

**3-(4-clorofenacil)-5-(4-metoxibenzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-25)**


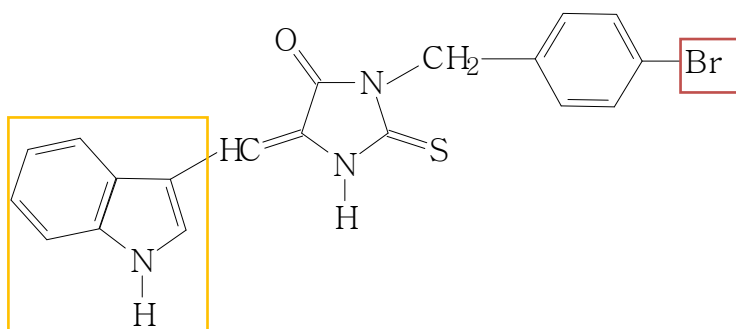
Fórmula Molecular:  $C_{19}H_{15}O_3N_2ClS$ ; Massa Molecular: 386,5g/mol; Ponto de Fusão: 183-185°C; Rendimento: 98%; Razão de Frente e Sistema: 0,56 *n*-Hex/AcOEt 6:4;  $^1H$  RMN (DMSO, 300MHz)  $\delta$ : 3,74 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 4,90 (s, 2H,  $CH_2$ ); 6,60 (s, 1H, CH); 6,53 (d, 2H,  $J = 8,39$  Hz); 7,72-7,75 (m, 4H); 8,17(d, 2H,  $J = 8,69$  Hz).

**5-(indol-3-ilmetileno)-3-(4-clorofenacil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-30)**



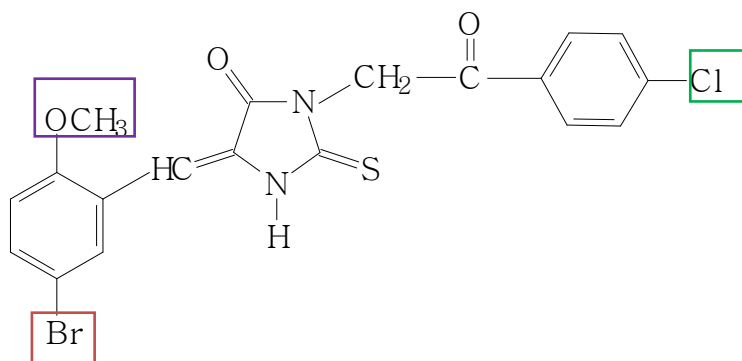
Fórmula Molecular:  $C_{20}H_{14}O_2N_3ClS$ ; Massa Molecular: 395,5g/mol; Ponto de Fusão: 237-239°C; Rendimento: 70%; Razão de Frente e Sistema: 0,45 Benz/AcOEt 1:1;  $^1H$  RMN (DMSO, 300MHz)  $\delta$ : 11,76 (s, 1H, N-H); 11,56 (s, 1H, N-H); 5,01 (s, 2H,  $CH_2$ ); 7,07 (s, 1H, CH); 8,12 (d, 2H,  $J = 8,39$  Hz); 7,66 (d, 2H,  $J = 8,39$  Hz); 8,07 (d, 1H,  $J = 7,79$  Hz); 8,10 (m, 1H); 7,40 (d, 1H,  $J = 7,79$  Hz); 7,13 (t, 1H,  $J = 6,89$  Hz); 6,92 (t, 1H,  $J = 7,79$  Hz); IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3336 (NH), 3096 (NH), 1708 (C=O), 1688 (C=O), 1590 (C=C), 1664 (C=S); MS,  $m/z$  = 395 ( $M^+$ ), 397 ( $M+H+2$ ) $^+$ , 363, 256, 139, 111, 96, 64.

**3-(4-bromobenzil)-5-(indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-52)**



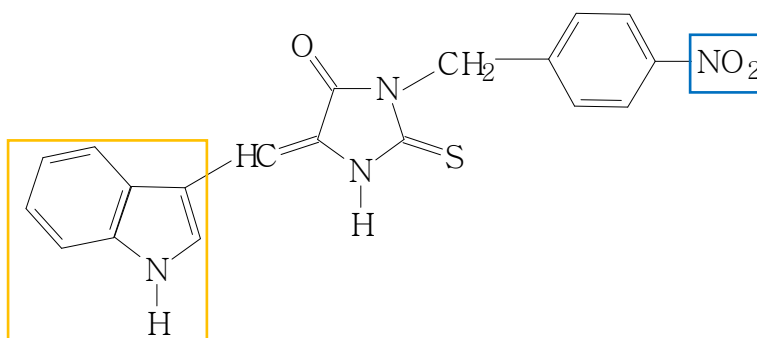
Fórmula Molecular:  $C_{19}H_{14}ON_3SBr$ ; Massa Molecular: 411,9g/mol; Ponto de Fusão: 217-219°C; Rendimento: 89%; Razão de Frente e Sistema: 0,51  $CH_2Cl_2$ /MeOH 9,5:0,5.

**3-(4-clorofenacil)-5-(2-metóxi-5-bromo-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-89)**



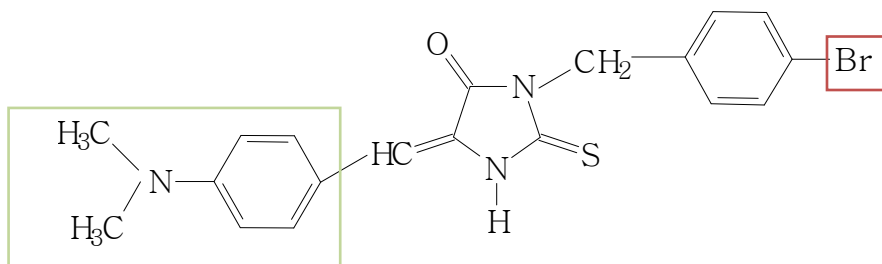
Fórmula Molecular:  $C_{19}H_{14}O_3N_2ClSBr$ ; Massa Molecular: 465,4g/mol; Ponto de Fusão: 190-192°C; Rendimento: 59%; Razão de Frente e Sistema: 0,48 *n*-Hex/AcOEt 6:4;  $^1H$  RMN (DMSO, 300MHz)  $\delta$ : 3,53 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,91 (s, 1H, CH); 6,97 (d, 2H, J = 8,96Hz); 8,48 (d, 2H, J = 8,83Hz); 7,41 (dd, 1H, J = 8,83Hz e J = 2,71 Hz) 7,62 (d, 1H, J = 8,49Hz) 8,58 (d, 1H, J = 2,71Hz); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3060 (NH), 1720 (C=O), 1680 (C=O), 1503 (C=C), 1629 (C=S); MS, m/z = 464 (M<sup>+</sup>), 467 (M+H)<sup>+</sup>, 468 (M+H+2)<sup>+</sup>, 435, 138, 74.

**5-(indol-3-ilmetileno)-3-(4-nitrobenzil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (/LPSF/NN-100)**



Fórmula Molecular:  $C_{19}H_{14}O_3N_4S$ ; Massa Molecular: 378g/mol; Ponto de Fusão: 228-230°C; Rendimento: 67,97%; Razão de Frente e Sistema: 0,81 *n*-Hex/AcOEt 1:1.

**3-(4-bromobenzil)-5-(4-dimetilaminobenzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-211)**



Fórmula Molecular:  $C_{19}H_{18}ON_3SBr$ ; Massa Molecular: 415,9g/mol; Ponto de Fusão: 220-222°C; Rendimento: 78%; Razão de Frente e Sistema: 0,54 *n*-Hex/AcOEt 7:3;  $^1H$  RMN (DMSO, 300MHz)  $\delta$ : 3,0 (s, 6H,  $CH_3$ ); 4,50 (s, 2H,  $CH_2$ ); 6,66 (s, 1H, CH); 11,59 (s, 1H, NH); 6,75 (d, 2H,  $J = 8,7Hz$ ); 7,43 (d, 2H,  $J = 8,4Hz$ ); 7,51 (d, 2H,  $J = 8,4Hz$ ); 8,01 (d, 2H,  $J = 8,7Hz$ ); IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3125 (NH), 1697 (C=O), 1503 (C=C), 1586 (C=S); MS,  $m/z$  415 ( $M^+$ ), 416 ( $M+H^+$ ), 417 ( $M+H+2^+$ ), 246, 187, 159.

## **5.2 Parte Biológica**

### **Animais**

Camundongos machos BALB/c (6 a 8 semanas de idade) foram criados no biotério da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, em Recife, Brasil. Todos os camundongos foram sacrificados e tratados de acordo com a Fundação Oswaldo Cruz, da Comissão de Experiências com Animais de Laboratório (Ministério da Saúde, Brasil, 0266/05).

### **Obtenção de células esplênicas**

Células esplênicas foram obtidas de acordo com Pereira e colaboradores (2004). Após sacrifício do animal em câmara de CO<sub>2</sub>, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 incompleto. No fluxo vertical, 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 incompleto por baço, centrifugadas a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, ao sedimento adiciona-se solução de lise, 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 ressuspensionado em meio RPMI 1640 completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi separada. Em seguida, diluída em azul de trypan para ser quantificada em câmara de Neubauer, assim como verificar a viabilidade celular.

### **Avaliação da Atividade Tóxica dos Compostos em Células de Camundongos Isogênicos**

Células esplênicas ( $6 \times 10^5$  células/poço), obtidas de acordo com item anterior, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura completo. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em seis concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml) e de timidina tritiada (1 µCi/poço) durante 24 h em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Para o controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%), células tratadas com DMSO (1%), e sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 µCi/poço). Cada composto foi testado em duplicata. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada

através do contador beta de cintilação ( $\beta$ -matrix 9600, Packard). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]\text{TdR}$ ) nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados. As concentrações atóxicas foram definidas como aquelas que causaram uma redução de  $^3\text{H}$ -timidina abaixo de 30% em relação aos controles não tratados.

### **Avaliação da Atividade dos Compostos contra *Trypanosoma cruzi***

Para determinar o efeito anti-proliferativo ou a  $\text{IC}_{50\%}$ , para formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), foram cultivados a  $26^\circ\text{C}$  em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de SBF (Soro fetal bovino), 1% hemina. Os parasitos ( $10^6/\text{ml}$ ) foram crescidos em culturas axênicas, na fase log de crescimento. Para determinar o  $\text{IC}_{50}$ , culturas de epimastigotas, na presença de diferentes concentrações dos compostos foram avaliadas após 11 dias. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) foram obtidas de sobrenadantes de cultura de linhagem de células Vero a  $37^\circ\text{C}$  e colocadas em placas de 96 poços ( $4 \times 10^5$ ) em meio RPMI 1640 completo. Após 24 h e 11 dias, parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. O cálculo da  $\text{IC}_{50\%}$  foi determinada por meio de uma regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

### **Dosagem das Citocinas Secretadas nos Sobrenadantes de Cultura**

A dosagem das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos sobrenadantes de cultura, foi realizada através do ELISA de captura, utilizando-se o Kit OptEIA, (BD Biosciences), seguindo orientações do fabricante. Placas de ELISA (Costar half-area plate-96 poços) foram sensibilizadas com 25 $\mu\text{l}$  dos anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 18h a  $4^\circ\text{C}$ . As placas foram lavadas três vezes com 300ml/poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com a solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tw. Os padrões das citocinas foram diluídos seriadamente (fator 2) em PBS pH 7,2 + 10% SFB a partir da concentração inicial recomendada pelo fabricante. Em seguida, 25 $\mu\text{l}$  da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h a TA. Quando necessário, as amostras eram diluídas em PBS pH 7,2 + 10% SFB. Após o tempo de

incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tw e 25ml dos anticorpos biotinizados específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB foram adicionados por 1h30min, a TA. Após nove lavagens com PBS-Tw, foram adicionados 100 ml da solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina] (KPL). A reação foi bloqueada com 25ml de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro (Bio-Rad 3550) a 415 nm. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml, utilizando o software Microplate Manager, versão 4.0 (Bio-Rad laboratories).

### **Dosagem de Óxido Nítrico**

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se à uma placa de ELISA de 96 poços (Costar half-area plate) 25 $\mu$ l do sobrenadante de cultura em duplicata (diluído em RPMI suplementado com SFB 2%, quando necessário), seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5% (solução A) e de N-1-naphtyl-ethylenodiamina, também diluído em solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 $\mu$ M passou por diluições seriadas (fator 2) em RPMI suplementado com 2% de SFB. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 490nm. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão, e os resultados obtidos expressos como a média da duplicata  $\pm$  erro padrão, utilizando-se o software Microplate Manager 4.0 (BioRad).

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As amostras foram lavadas duas vezes em PBS e fixados por duas horas numa solução contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2. Lavados três vezes em tampão cacodilato 0,1M e pós-fixados, durante uma hora, numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 2mM  $\text{CaCl}_2$  e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2. Foram lavados no mesmo tampão, contrastados em bloco com acetato de uranila a 2% e desidratados em acetona. Para finalizar o processamento as amostras

foram infiltradas e emblocadas em resina Epon 812 (Sigma Company, St Louis, MO). A polimerização foi feita a 60 °C por 3 dias e cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel 300-mesh, contra-corados com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo, e analisados com um microscópio eletrônico de transmissão, Morgani FEI 268d.

### **Análise da viabilidade celular**

Esplenócitos de camundongos BALB/c ( $10^6$  células) foram centrifugados a 4 °C, 450 x g por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de PBS 1X e foram centrifugadas a 4 °C, 450 x g por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em tampão de ligação (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>) e foi adicionado anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC ) (1:500) e de iodeto (PI, 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $10^6$  células) em cada tubo. A citometria de fluxo foi realizada em um FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, CA, E.U.A.) analisada através do software Pro Cell Quest (Becton Dickinson). Duplo positivo (Annexin-FITC +/PI+) foi considerado células esplênicas na fase final do processo apoptótico, enquanto que somente as células PI+, foram células necróticas. Anexina-FITC +/PI- foi considerado esplenócitos na fase inicial da apoptose. Dupla negativa foi considerada células viáveis.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados por testes não-paramétricos. Para detectar diferenças entre os grupos, o teste de Mann-Whitney U e teste t foram utilizados. Todos os resultados foram expressos pelos valores médios dos grupos  $\pm$  desvio padrão e foram analisados considerando o valor de  $p < 0,05$  (estatisticamente significativo).

# Resultados

---

## 6 RESULTADOS

Com o intuito de avaliar a ação dos derivados imidazolidínicos contra as formas tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram realizados os ensaios de citotoxicidade, atividade anti-parasitária e imunomoduladora, análise ultraestrutural e apoptose. Os valores da atividade anti-*T. cruzi* (cepa Y) foram expressos em IC<sub>50</sub> (µg/ml). A citotoxicidade foi expressa como a maior concentração atóxica testada em esplenócitos de camundongos BALB/c. Os fármacos benzonidazol e nifurtimox foram utilizados como padrão.

Os resultados demonstram (Tabela 3) que entre os sete compostos testados *in vitro*, o derivado LPSF/NN-25 foi o que apresentou o melhor resultado para a citotoxicidade no valor de 50µg/mL, quando comparados com outros derivados. O LPSF/NN-89 e LPSF/NN-211 apresentou citotoxicidade acima de 5µg/mL. Os derivados LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 foram os que apresentaram melhores atividades anti-*T. cruzi* nas suas concentrações atóxicas, com a IC<sub>50</sub> de 13,17 e 12,8µg/mL para a forma tripomastigota e 24,68 e 14,44µg/mL para epimastigota, respectivamente.

TABELA 3

Efeitos *in vitro* dos derivados imidazolidínicos (LPSF/NN)  
*Trypanosoma cruzi* cepa Y

| Composto     | Tripomastigota 24h<br>IC <sub>50%</sub> (µg/mL) | Epimastigota 11dias<br>IC <sub>50%</sub> (µg/mL) | Citotoxicidade |
|--------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------|
| LPSF/NN-20A  | 21,38                                           | 33,50                                            | <1             |
| LPSF/NN-25   | ND                                              | ND                                               | 50             |
| LPSF/NN-30   | ND                                              | ND                                               | 25             |
| LPSF/NN-52   | 13,17                                           | 24,68                                            | 5              |
| LPSF/NN-89   | 13,29                                           | 54,87                                            | 5              |
| LPSF/NN-100  | 12,8                                            | 14,44                                            | 1              |
| LPSF/NN-211  | 50,72                                           | 26,64                                            | 5              |
| Benzonidazol | 1,63                                            | 1,73                                             | 25             |
| Nifurtimox   | 0,79                                            | 0,54                                             | 1              |

ND – são valores não determinados, ou seja, foram testados, mas não foi possível fazer a análise de regressão linear.

Analisando as estruturas químicas dos derivados LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100, podemos observar que ambos os derivados possuem em sua estrutura um radical indol na posição 5 do anel imidazol. Este radical está presente na estrutura de alguns anti-inflamatórios como a Indometacina. Introduzida em 1963, a indometacina é um derivado indólico, trata-se de um potente inibidor não-seletivo da COX, que também pode inibir a fosfolipase C. Os inibidores da ciclooxygenase, tais como, aspirina e indometacina, bloqueiam a produção de TGF- $\beta$  e poliaminas, reduzindo a parasitemia (DOSREIS, 2009). Na doença de Chagas a enzima fosfolipase C está diretamente relacionada com a invasão celular pelo parasito, através da modificação de Cálcio intracelular, resultando em alterações do citoesqueleto, facilitando a entrada do parasito na célula do hospedeiro (YOSHIDA, 2009).

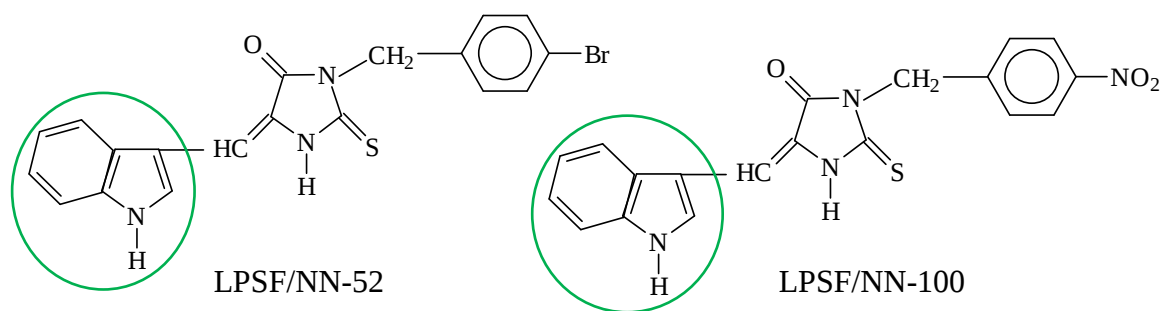


Figura 34 – Estrutura química dos derivados LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100

Os compostos aromáticos e heteroaromáticos que possuem o grupo nitro são considerados agentes potenciais no tratamento de várias parasitoses, inclusive têm sido amplamente usados como fármacos (DJURIC, 1993). As propriedades do radical nitro ocorrem pela ação das nitrorredutases. Durante a metabolização, a redução do grupo nitro associa-se com a alteração do número de elétrons nos últimos orbitais, aumentando seu potencial e, conseqüentemente impedindo a proliferação do parasito. Esse fato pode explicar o motivo pelo qual o derivado LPSF/NN-100 apresentar os melhores resultados para a atividade anti-*T. cruzi*.

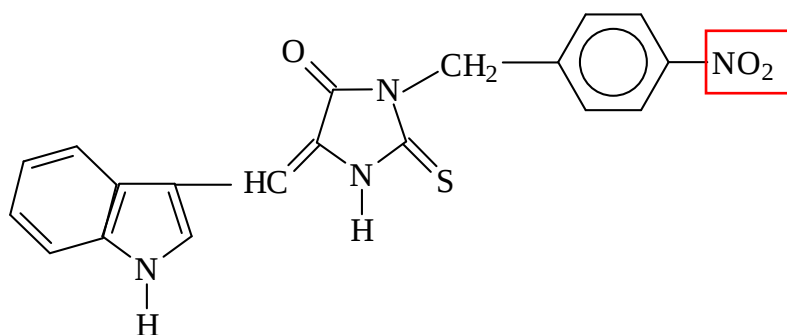


Figura 35 – Estrutura química do derivado LPSF/NN-100 com o radical nitro destacado.

A partir dos resultados da atividade anti-parasitária obtidos foi investigado o efeito imunomodulador do derivado que mostrou ser mais eficaz contra *T. cruzi*. A produção de citocinas e óxido nítrico foi avaliada *in vitro* a partir de sobrenadantes de cultura coletados. O composto LPSF/NN-100 foi utilizado nessas avaliações nas concentrações de 100, 10 e 1  $\mu\text{g/mL}$ . Os mitógenos Fitohemaglutinina (PHA - 5 $\mu\text{g/mL}$ ) e Concavalina (Con A - 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ) foram usados como controle positivo e células sem estímulo (meio + células) como controle negativo.

Investigar a produção de IL-10 é extremamente importante já que esta citocina é necessária para minimizar os efeitos tóxicos causados por uma grande produção das citocinas inflamatórias IL-12 e IFN- $\gamma$  produzidas durante a infecção. Além de facilitarem a replicação dos parasitos também inibem a indução da enzima óxido nítrico sintase (HERRERO, 2003). A IL-10 funciona como uma citocina imunoregulatória, sendo produzida por macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (MOORE, 2001; KAMANAKA, 2006). Consequentemente, a produção de IL-10 pode inibir a resposta pró-inflamatória em vários parasitos como *Leishmania spp.* (MURPHY, 2001) e *T. cruzi* (REED, 1994). Por outro lado, IFN- $\gamma$  é um poderoso fator de ativação de macrófagos, ele é produzido pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e macrófagos e induzem a expressão de moléculas MHC I e MHC II em diferentes tipos de células (KÜSTERS, 1996). Enquanto a IL-10 é secretada por células Th2, acarretando um aumento na suscetibilidade à infecção, o IFN- $\gamma$  é secretada por células Th1 e está envolvido na imunidade celular contra patógenos intracelulares, eliminando as formas intracelulares do parasita, e está associado com a resistência a infecção pelo *T. cruzi* (SHER e COFFMAN, 1992; ROMAGNANI, 1996). Embora o LPSF/NN-100 tenha estimulado a produção de IL-10, os valores não foram estatisticamente significativos.

Como IL-10 e IFN- $\gamma$ , o óxido nítrico é, preferencialmente, produzido por células Th1 através de um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e é um importante mediador de resposta imune (TAYLOR-ROBINSON, 1994). Este composto, produzido em níveis mais elevados por macrófagos, tem atividade citotóxica contra microorganismos, parasitas, células tumorais e exerce uma função importante na modulação do sistema imune (MONCADA, 1991). Durante a infecção por *T. cruzi*, o NO pode modular direta ou indiretamente a máquina efetora de leucócitos através de mecanismos diversos. Este processo envolve efeito microbicida derivado dos radicais livres tóxicos (superóxido e peroxinitrito) gerados após a produção de NO, bem como a regulação da resposta inflamatória induzida durante a infecção. O potencial citotóxico do NO depende da sensibilidade do parasito, ou seja, o tipo de cepa. Muitos estudos têm demonstrado que o NO é a principal molécula efetora envolvida na morte mediada por macrófagos de formas amastigotas de *T. cruzi* (NATHAN e SHILOH, 2000; COLASANTI, 2002). Além disso, estudos têm mostrado que compostos que induzem a produção de óxido nítrico possuem potencial imunomodulador (KORHONEN, 2008). A produção significativa de IFN- $\gamma$  foi observada apenas no 6 dia de cultura (Figura 34). O IFN- $\gamma$  é uma das citocinas mais relacionadas à infecção pelo *T. cruzi* e desempenha papel central em induzir a ativação de macrófagos e a inibição da replicação intracelular dos parasitos, além de ser necessário para a eliminação dos parasitos, através da indução da produção de óxido nítrico.

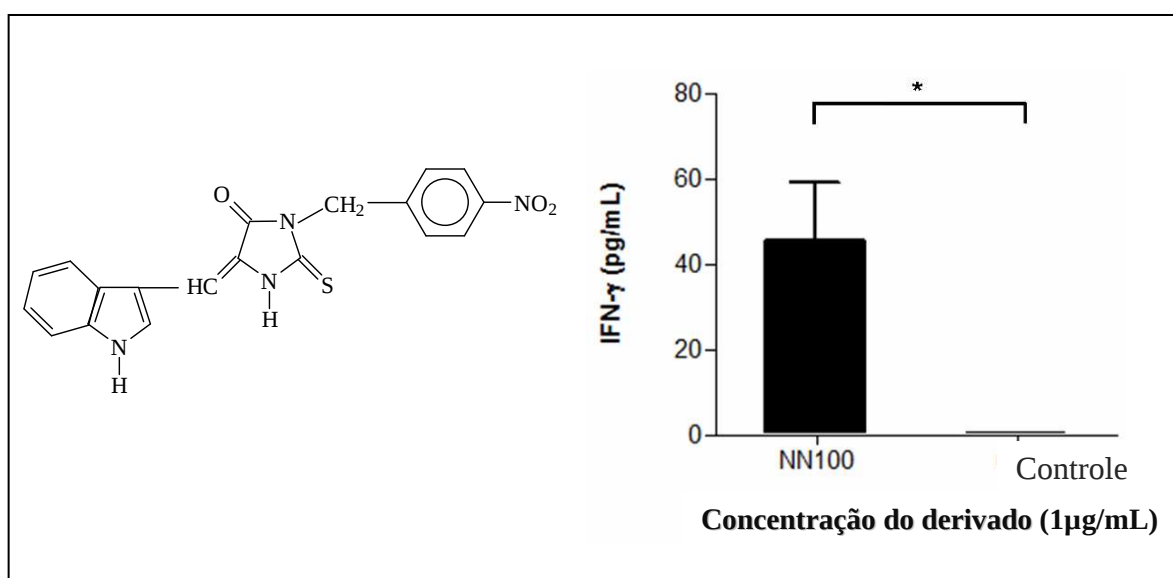


Figura 36 - Produção de IFN-  $\gamma$  em culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c. Após 6 dias do ensaio experimental com o LPSF/NN-100 na concentração de 1  $\mu$ g/ml (\*p< 0,05).

Observou-se que a resposta Th1 representada pela produção de IFN- $\gamma$ , uma das maiores citocinas ativadoras de macrófagos, pode ter inibido a resposta Th2. Esse resultado foi comprovado pelos baixos níveis de IL-10. Esses resultados são demonstrados por outros autores que mostraram que a IFN- $\gamma$  produção por células Th1 inibe a proliferação de células Th2, limitando a produção das citocinas IL-4 e IL-10 (SCHRODER, 2004).

Estudos afirmam que os mecanismos dependentes IFN- $\gamma$  são, em parte, mediados pela produção de óxido nítrico (NO). Na ausência de receptores de IFN- $\gamma$ , o NO não é produzido por macrófagos, sugerindo que o IFN- $\gamma$  é o principal indutor da NOS2 (RODRIGUES, 2009). O fato do IFN- $\gamma$  atuar como agente protetor na infecção atribui-se à sua capacidade de ativar a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO) (GUTIERREZ, 2009). A produção de NO nos esplenócitos em resposta aos mitógenos ConA (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e PHA (5  $\mu\text{g/mL}$ ) foi positiva em todos os grupos avaliados e em todos os tempos de cultura. Analisando a resposta frente ao estímulo PHA, foi observada diferença significativa (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos nos tempo de 24h e 48h (Figura 35 A e B).

Em relação ao LPSF/NN-100 a produção de NO foi estimulada em todos os tempos do ensaio experimental. Em 24 horas o LPSF/NN-100 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$  e 1 $\mu\text{g/mL}$  estimulou mais a produção de NO do que os mitógenos Con A e PHA. Após 48 horas o mesmo derivado produziu mais NO apenas em relação a ConA (Figura 35A e B).

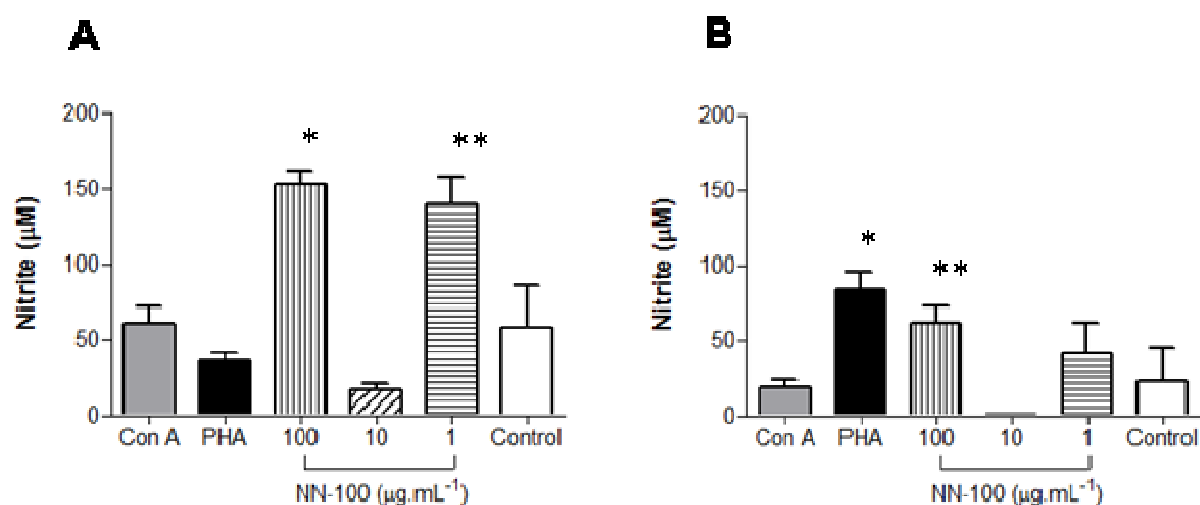


Figura 37A e B - Produção de NO em culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c. Após 24 e 48 horas do ensaio experimental com o LPSF/NN-100.

Em 72 horas, este derivado apresentou valores mais altos na 1µg/ml do que o controle e a ConA. No sexto dia do ensaio experimental o LPSF/NN-100 na concentração de 100µg/ml e 10µg/ml não produziram NO, mas na concentração de 1µg/ml apresentou valores estatisticamente significativos em relação a ConA (Figura 36A e B).

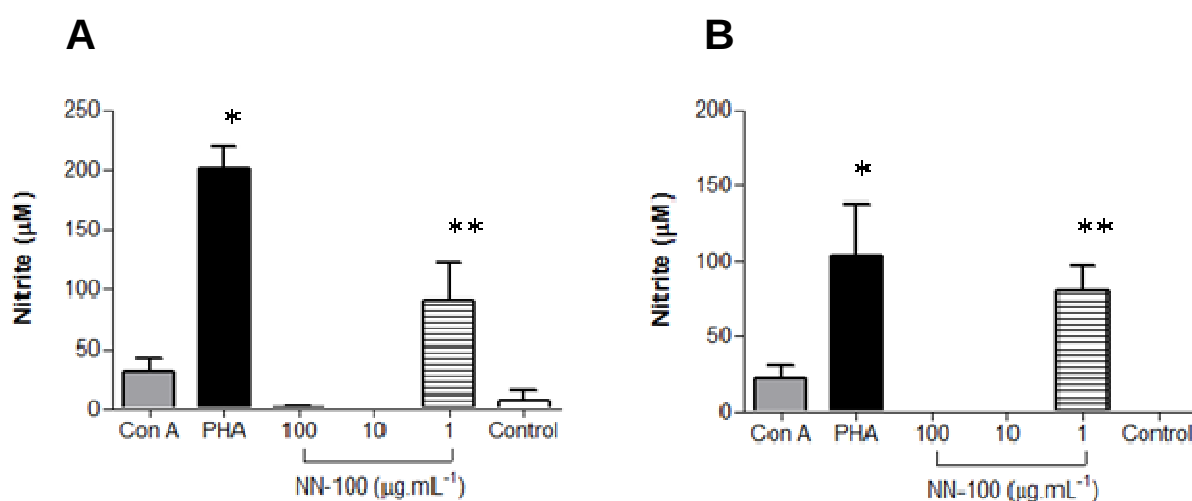


Figura 38A e B - Produção de NO (µg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c. Após 72h e seis dias do ensaio experimental com o LPSF/NN-100 nas concentrações de 100 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml (\*p<0,05).

A eliminação do parasito depende diretamente da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, que agem em conjunto ativando macrófagos para eliminar o parasito intracelular através da produção de NO e de seus derivados de nitrogênio e radicais de oxigênio. Entre outras atividades o NO também pode alterar o funcionamento de complexos enzimáticos imprescindíveis para o metabolismo celular, inibir a duplicação do DNA ou causar danos diretos no DNA, sugerindo que o NO não só pode inibir a replicação, mas também pode induzir a morte celular (SACKS, 2002).

Investigando a possibilidade dos derivados LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 provocarem alterações na morfologia do *T. cruzi*, foi realizada análise estrutural. A concentração utilizada dos derivados foi de  $13\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Formas tripomastigotas sem tratamento foram utilizadas como controle. Com isso, suas características morfológicas preservadas como descrito por De Souza, 2009.

Os resultados indicaram que formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) tratados com os derivados imidazolidínicos LPSF/NN-52 (Figura 37) e LPSF/NN-100 (Figura 38) por 24 h, revelaram graves danos quando comparados com os parasitos não tratados (Figura 37a). As alterações morfológicas mais evidentes, nos parasitos tratados com o LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 foram observadas no complexo mitocondrial (colapso e fragmentação) (Figura 37c) e no núcleo (endentado e cromatina dispersa no nucleoplasma) (Figura 37b), esses resultados indicam que os compostos podem induzir o processo necrótico.

A mitocôndria dos Trypanosomatidae apresenta características estruturais e funcionais únicas que são bastante distintos das mitocôndrias dos mamíferos. Apresenta uma estreita relação com o cinetoplasto, e não há continuidade estrutural entre as paredes de ambas as organelas, tornando-se essa organela um alvo excepcionalmente atraente para a quimioterapia da doença de Chagas (VAN HELLEMOND, 2005; DE SOUZA, 2008).

Esses resultados também foram observados por outros autores, como colapso no complexo mitocondrial e dilatação do vacúolo citoplasmático pela ação de dois inibidores, BPQ-OH e ER27856, da enzima esqualeno sintase, usados contra as formas epimastigotas (BRAGA, 2004). Os resultados indicam que o efeito dos derivados imidazolidínicos está associado à disfunção da mitocôndria, causando a morte do parasito. Esse efeito pode ser consequência da mudança no balanço redox do parasito.

Outras alterações frequentes nos parasitos tratados foram a formação de corpos mielínicos (Figura 37b); alargamento do vacúolo citoplasma (Figura 38b, d); fragmentação do retículo endoplasmático (Figura 37c e 38e). A presença de inclusões (Figura 37b e 38a, d, f) lipídicas pode indicar que estes derivados atuam na via de biossíntese de esterol.

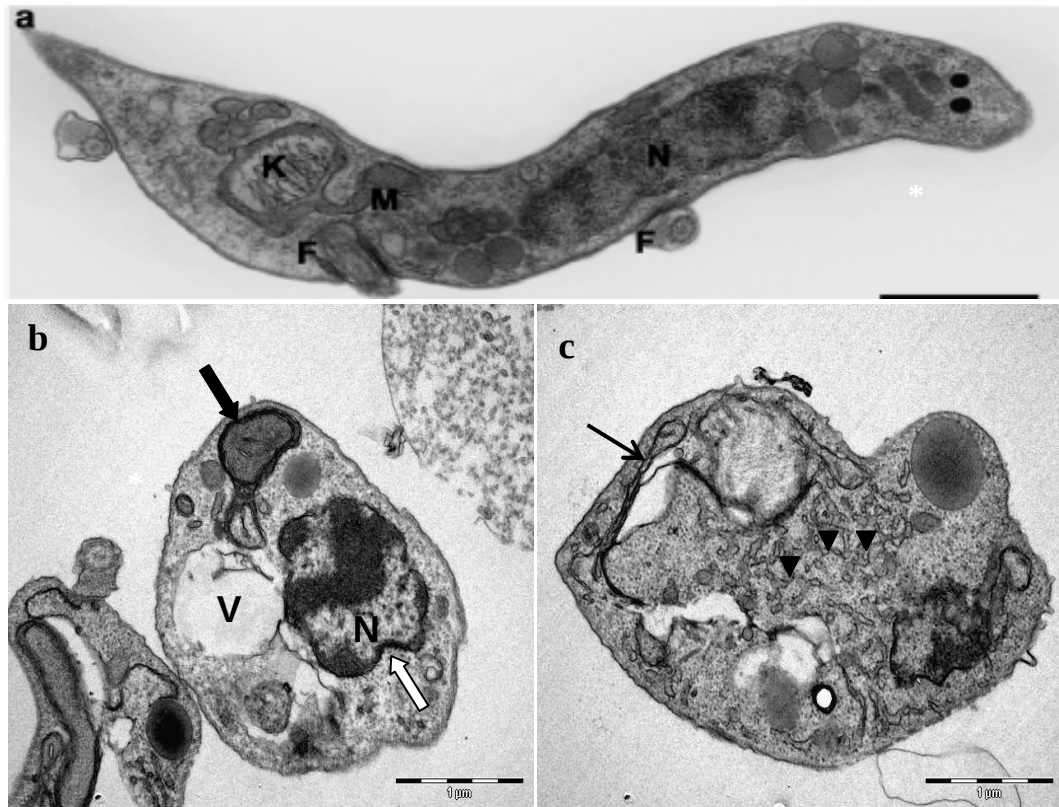


Figura 39 - Formas tripomastigotas de *T. cruzi*. tratados com o derivado imidazolidínico (LPSF/NN-52) (a) Imagem MET de parasitos não tratados, com a morfologia típica preservada: cinetoplasto normal (K), núcleo (N), e flagelo (F). (b-c) Imagem de MET dos parasitos tratados com  $13\mu\text{g.mL}^{-1}$  do LPSF/NN-52. (b) Núcleo endentado em processo de necrose, cromatina dispersa dentro do nucleoplasma e ruptura da membrana nuclear, (seta branca), inclusões lipídicas (asterisco branco); Formação de corpos mielínicos (seta larga), Dilatação do vacúolo citoplasmático (V). (c) Colapso do complex mitocondrial (seta fina), Fragmentação do reticulo endoplasmático (ponta da seta). Bars, 1  $\mu\text{m}$ .

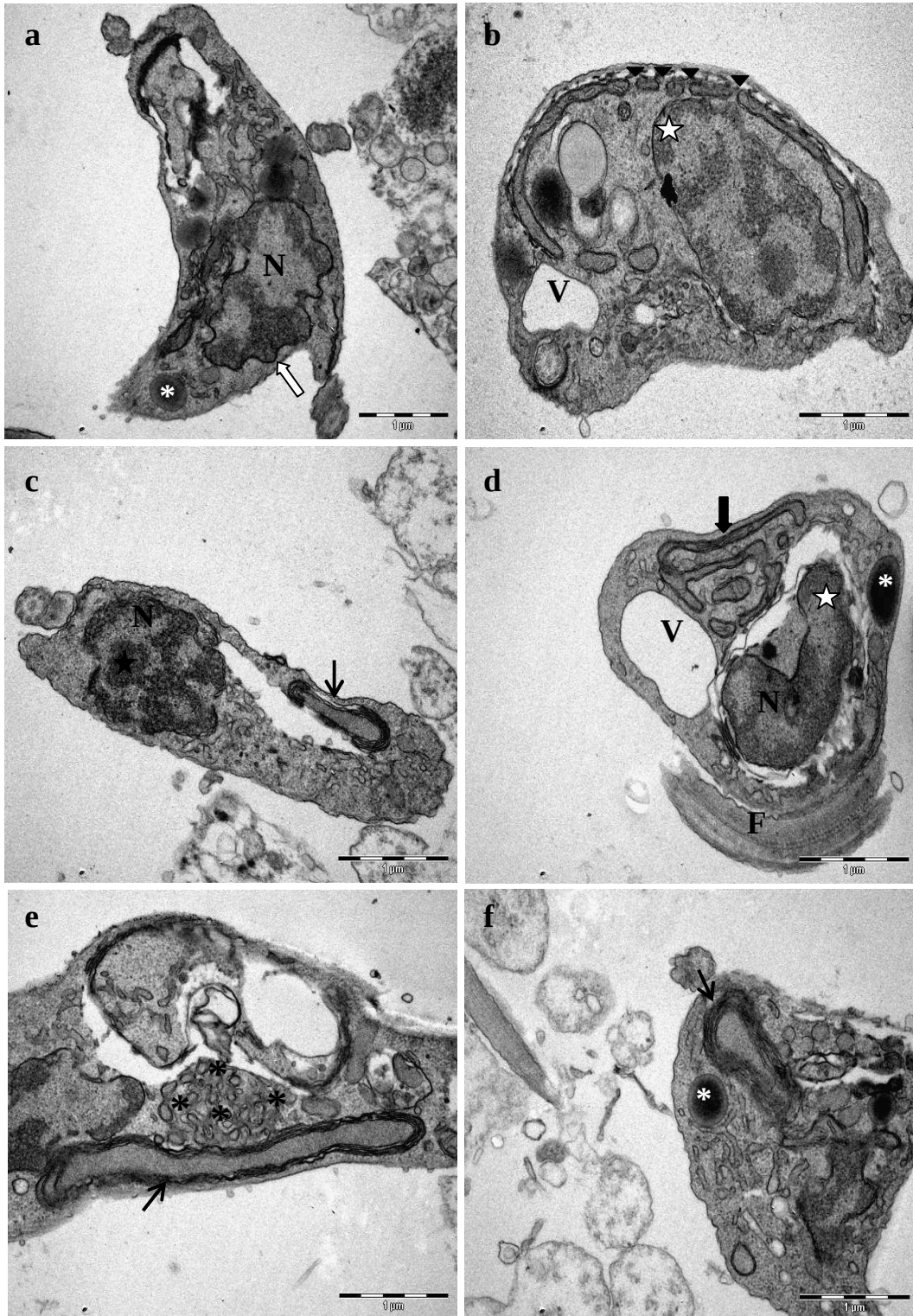


Figure 40 - Formas tripomastigotas de *T. cruzi*. tratados com o derivado imidazolidínico (LPSF/NN-100). (a-f) Imagens de MET dos parasitos tratados com  $13\mu\text{g.mL}^{-1}$  de LPSF/NN-100. (a) Núcleo endentado, com evidencia de processo necrótico (seta branca). (a,d,f) Inclusões lipídicas (asterisco branco). (b,d) Dilatação do vacúolo citoplasmático (V), e do envelope nuclear (estrela branca). (b) Fragmentação do complexo mitocondrial (ponta de seta). (c) Condensação da cromatina (estrela preta). (c,e,f) Colapso do complexo mitocondrial (seta fina). (d) Desorganização do complexo mitocondrial (seta larga). (e) Fragmentação do reticulo endoplasmático (asterisco preto). Bars, 1  $\mu\text{m}$ .

Em esplenócitos de camundongos BALB/c, foi avaliado o potencial dos derivados LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 de induzirem apoptose, apoptose tardia e necrose. Após 24h foi observado que o LPSF/NN-100 induziu mais apoptose em relação ao benzonidazol, nifurtimox e LPSF/NN-52 (Figura 39A). Em apoptose tardia o LPSF/NN-52 apresentou resultados mais expressivos em relação aos outros compostos (Figura 39B). Em necrose o nifurtimox se destacou quando comparado com os outros compostos, mas em nenhum dos três eventos os resultados foram maiores que o controle. Isso indica que a indução de apoptose, apoptose tardia e necrose pelos derivados imidazolidínicos não apresentaram valores estatisticamente significativos (Figura 39C).

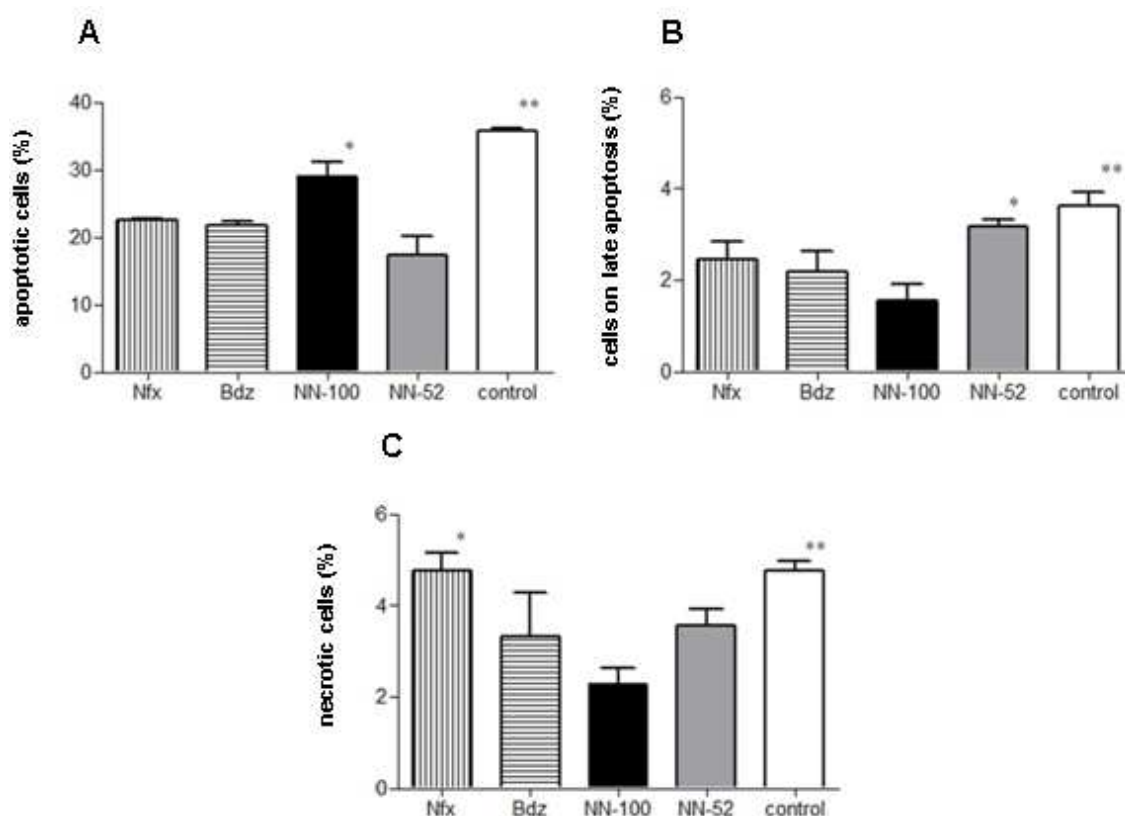


Figura 41A, B e C – Efeito dos derivados imidazolidínicos na viabilidade celular de esplenócitos de camundongos após 24 horas. A – Ensaio de apoptose utilizando anexina V. os valores do LPSF/NN-100 foi estatisticamente superior em relação ao benzonidazol e nifurtimox, mas não em relação ao controle. B - ensaio de apoptose tardia utilizando anexina V e iodeto de propídio. Todos os compostos não foram estatisticamente significativa em relação ao controle das células. C - Ensaio de necrose com iodeto de propídio. Nifurtimox foi superior aos outros compostos, mas não apresentou valores estatísticos em relação ao controle das células. \*  $p < 0,05$ .

Em 48h foi observado que o LPSF/NN-100 induziu mais apoptose, apoptose tardia e necrose em relação ao benzonidazol, nifurtimox e LPSF/NN-52 (Figura 40A, B e C). Apenas em necrose o LPSF/NN-100 apresentou valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Por outro lado, o LPSF/NN-52 estimulou menos apoptose e necrose quando comparados com o benzonidazol e nifurtimox. A partir desses resultados, pode-se sugerir que o derivado LPSF/NN-52 possivelmente atue como um inibidor na indução de apoptose.

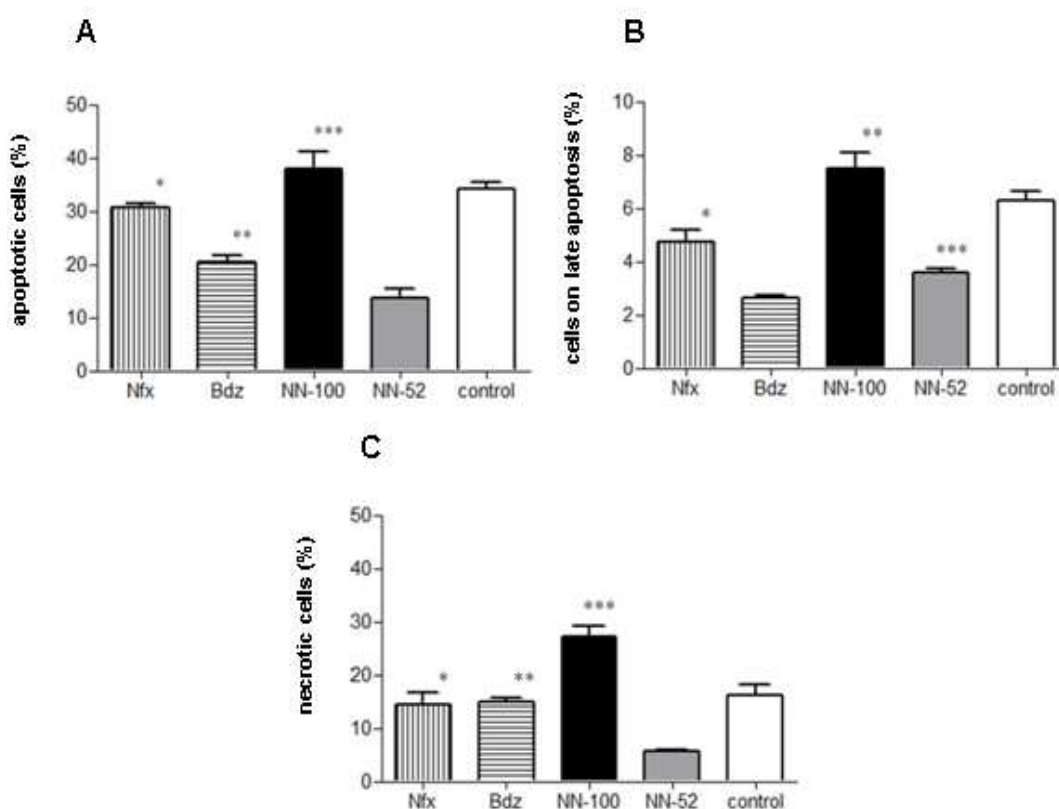


Figura 42 – Efeito dos derivados imidazolidinicos sobre a viabilidade celular de esplenócitos de camundongos após 48 horas de ensaio. A - LPSF/NN-100 foi estatisticamente superior em relação aos fármacos de referência, mas não em relação ao controle em apoptose. B – Ensaio de apoptose - tardia mostrou que o LPSF/NN-100 apresentou valores superiores em relação à benzonidazol, nifurtimox e LPSF/NN-52, mas não em relação ao controle. C - Em necrose o LPSF/NN-100 foi o composto que apresentou valores maiores em relação a benzonidazol, nifurtimox e LPSF/NN-52 e controle. \*  $p < 0,05$ .

Em 72h do ensaio experimental o benzonidazol induziu mais apoptose e apoptose tardia do que nifurtimox, LPSF/NN-52 e LPSF/NN-100 (Figura 41A e B). Entretanto este fármaco, no mesmo tempo de experimento, não apresentou valores maiores que o LPSF/NN-100 na indução de necrose (Figura 41C). Embora o benzonidazol e o LPSF/NN-100 tenham apresentado valores mais expressivos comparados com os outros compostos, eles não apresentaram valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Esses resultados comprovam que em 72 horas também não houve valores significativos para apoptose, apoptose tardia e necrose promovido pelos fármacos de referencia e pelos derivados imidazolidinicos.

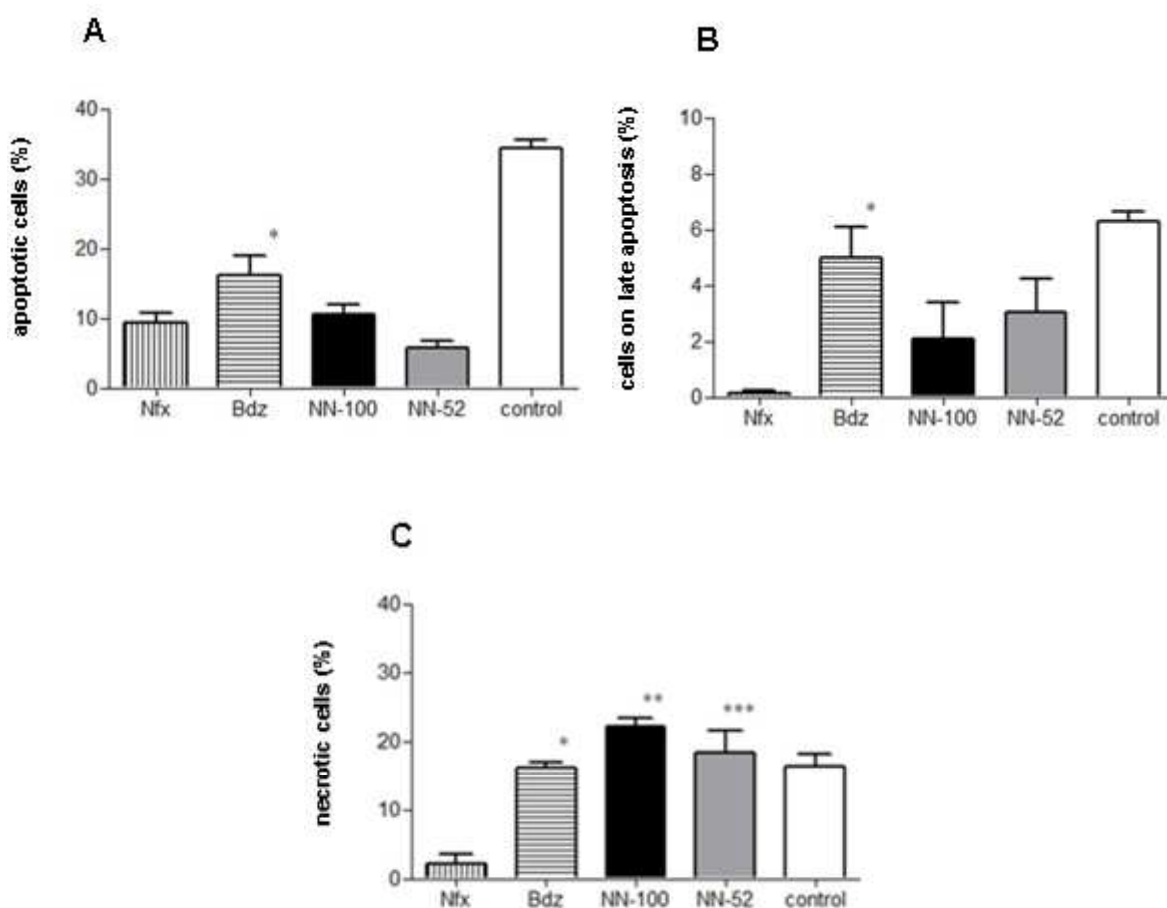


Figura 43 - Efeito dos derivados imidazolidinicos sobre a viabilidade celular de esplenócitos de camundongos após 72 horas de ensaio. A – Em apoptose o benzonidazol apresentou valores superiores em relação ao LPSF/NN-52, mas não em relação ao controle. B – Em apoptose tardia o benzonidazol também demonstrou valores maiores, mas agora em relação ao nifurtimox. C - Em necrose o LPSF/NN-100 apresentou valores superiores ao nifurtimox, benzonidazol e LPSF/NN-52, mas não apresentou valores estatísticos em relação ao controle. \* $p < 0,05$ .

**Conclusão**

---

## 7 CONCLUSÕES

Os compostos LPSF/NN100 e LPSF/NN52 apresentaram inibição no crescimento de formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, sugerindo potencial atividade tripanocida;

O composto LPSF/NN100 estimulou a produção de IFN- $\gamma$  e de óxido nítrico, sugerindo atividade imunomoduladora;

Alterações ultraestruturais no complexo mitocondrial, dilatação no vacúolo citoplasmático e núcleo endentado com cromatina dispersa no citoplasma levando a processo necrótico, promovidas nas formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* apresentam-se como potenciais alvos de ação dos compostos LPSF/NN100 e LPSF/NN52;

**Perspectivas**

---

## 8 PERSPECTIVAS

Determinar *in vivo* a atividade anti-parasitária das substâncias avaliadas neste trabalho, sobre formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;

Desenvolver e avaliar novas moléculas que permitam a obtenção de novos derivados ainda mais potentes que os testados nessa dissertação;

Determinar *in vitro* a atividade anti-parasitária das substâncias avaliadas sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*;

Investigar a possibilidade do derivado LPSF/NN-52 inibir a apoptose em esplenócitos de camundongos BALB/c;

Avaliar a toxicidade aguda dos derivados da série LPSF/NN de forma a avaliar sua viabilidade como fármacos.

## Referências

---

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, I. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AGUIRRE, G.; CABRERA, E.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; SEOANE, G.; DUFFAUT, A.; DENICOLA, A.; GIL, M. J.; MARTINEZ-MERINO, V. Desing, synthesis and biological evalution of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational desing. *Eur. J. Med. Chem.*, 39, p. 421-431, 2004.
- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 64: 1961-1967, 1996.
- ANDRADE, S. G. Biodemas, zimodemas e esquizodemas: sua relação com a patologia da doença de Chagas. In: COURA, JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.
- ANDRADE, V. et al. Pathogenesis of Chagas' disease. *Research Immunology*, v.142, p. 126-129, 1991.
- ARAÚJO, A.; JANSEN, A. M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitology of Chagas disease: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Supl. I): 9-16, 2009.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. *Doença de Chagas: manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz / Instituto Oswaldo Cruz, 2000.
- AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M.. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2034-2039, 2004.
- BACCHI, C. J.; BRAUNSTEIN, V. L.; RATTENDI, D.; TARLETT, N.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H. B. Stage-specific polyamine metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot Microbiol. Suppl.*, 201S-202S, 2001.
- BASTOS, I. M.; GRELLIER, P.; MARTINS, N. F.; CADAVID-RESTREPO, G.; DE SOUZA-AULT, M.R.; AUGUSTYNS, K.; TEIXEIRA, A. R; SCHREVEL, J.; MAIGRET, B.; DA SILVEIRA, J. F.; SANTANA, J. M. Molecular, function and structural properties of the propyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80) that is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem. J.*, 2004.
- BÉRENGER, J. M. & BLANCHET, D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 733-736, 2007.
- BERN, C. et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. *Jama*, 298 (18): 2.171-2.181, 2007.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D. C, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, 309, p. 416-422, 2005.

BI, X.; LOPEZ, C.; BACCHI, C. J.; RATTENDI, D.; WOSTER, P. M. Novel alkylpolyaminoguanidines and alkylpolyaminobiguanides with potent antitrypanosomal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, p. 3229-3232, 2006.

BLOOM, B. R. et. al. Revising and revising suppressor T cells. *Immunol Today*, v. 13, p. 131-136, 1992.

BOCK, M.; GONERT, R. & HABERKORN, A. Studies with bay 2502 on animals. *Boletín Chileno de Parasitología*, 24: 13-19, 1969.

BOURGUIGNON, S.C et al. Biological aspect of the *Trypanosoma cruzi* (Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote, obtained in modified liver infusion tryptose (LIT) medium. *Acta Trop.*, v. 98, n. 1, p. 103-109, 2006.

BOUTEILLE, B. et al. treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 17, p. 171-181, 2003.

BRAGA, M. V.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 24, 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 Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2004.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev. Microbiol*, v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z. & CHIARI, E. Suscetibilidade de diferentes amostras de trypanosoma cruzi a vários agentes quimioterápicos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 9: 197-207, 1967.

BRENER, Z.; COSTA, C. A. G & CHIARI, C. A. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18: 450-455, 1976.

BRENER, Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO*, v. 347, p. 11-21, 1997.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 643 p, 1979.

BRENER, Z. & GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 114:103-110, 1997.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 122-135, 2009.

BRODSKYN, C. I & BARRAL-NETTO M. Resposta imune humana na doença de Chagas. In: BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETTO M. Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 171-176, 2000.

BUSTAMANTE, J. M.; BIXBY, L. & TARLETON, R. L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8<sup>+</sup> T central memory response in chronic Chagas disease. Nat Med, 14: 542-550, 2008.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Síntese de glicoaminoácidos de interesse biológico. Quim. Nova, v. 31, No. 5, 1027-1033, 2008.

CANÇADO, J. R. Doença de Chagas. Belo Horizonte, 1968.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 44: 29-37, 2002.

CARVALHEIRO, J. R et al. Clássicos em Doença de Chagas: histórias e perspectivas. RJ: Editora FIOCRUZ, 2009.

CERBÁN, F. et al. IgG isotype profiles induced in mice by two Trypanosoma cruzi electronegative antigens. Int Arch Allergy Appl Immunol, v. 96, p. 35-40, 1991.

CHAGAS, C.; CHAGAS, E. Manual de doenças tropicais e infectuosas. RJ: Oficinas Graphics da Empresa Laemmert, v. 1, 1935.

CHAGAS FILHO, C. Cenas da vida de Carlos Chagas. Ciência e cultura, 31 (supl.), p. 5-14, 1979.

COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (review). Int J Mol Med 9: 131-134, 2002.

COPE, A.C. Condensations reactions. I. The condensation of ketones with cyanoacetic esters and the mechanism of the Knoevenagel reaction. J. Am. Chem. Soc., v. 59, p. 2327-2330, 1937.

COPE, A.C.; HOFMANN, C.M.; WYCKOFF, C.; HARDENBERGH, E. Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic esters. J. Am. Chem. Soc., v. 63, p. 3452-3456, 1941.

CORRÊA, A. D. O grande brasileiro Carlos Chagas. J Bras Méd, v. 70, n. 5, p. 124-132, 1995.

COSTA, J. M.; ARGOLO, A. M & FÉLIX, M. Redescription of Triatoma melânica Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa, 1.385: 47-52, 2006.

COSTA, J.; LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 46-51, 2009.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 113-122, 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P.; Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 104 (Suppl. I): 31-40, 2009.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 3-24, 2002.

COURA, J. R.. & CANÇADO, J. R. A história da terapêutica da doença de Chagas. Disponível em : Portal Doença de Chagas, <[www.fiocruz.br/chagas](http://www.fiocruz.br/chagas)> Acesso em: 19 out.2009.

CORDEIRO, A. T.; MICHELS, P. A.; DELBONI, L. F.; THIEMANN, O. H. The crystal structure of glucose-6-phosphatase isomerase from *Leishmania mexicana* reveals novel active site feature. Eur. J. Biochem., 271, p. 2765-2772, 2004.

DAMATTA, R. A; SEABRA, S. H; DEOLINDO, P; ARNHOLDT, A. C; MANHÃES, L; GOLDENBERG, S; DE SOUZA, W. Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. FEMS Microbiol Lett 266: 29-33, 2007.

DANTAS, A. P. et al. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. J Submicrosc Cytol Pathol, v. 35, n. 3, p. 287-294, 2003.

DELVES, P. J. et al. Roitt's essential immunology. 11.ed. Black-well Publishing; 2006.

MENNA-BARRETO, R. F. S; SALOMÃO, K; DANTAS, A. P; SANTA-RITA, R. M; SOARES, M. J; BARBOSA, H. S; DE CASTRO, S. L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. Micron 40:157–168, 2009.

DE GOUW, H. W; MARSHALL-PARTRIDGE, S. J; VAN DER VEEN, H; VAN DEN AARDWEG, J. G; HIEMSTRA, P. S; STERK, P. J. Role of nitric oxide in the airway response to exercise in healthy and asthmatic subjects. J Appl Physiol 90: 586-592, 2001.

DE SOUZA, W. Macro, micro and nanodomains in the membrane of parasitic protozoa. Parasitol Int 56: 161-170, 2007.

DE SOUZA W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: 313-325, 2008.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 89-100, 2009.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, Article ID 642502, p. 19, 2009.

- DIAS, J. C. P. 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 (Suppl. I): 11-18, 2007.
- DIAS, J. C. P.; PRATA, A. R.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop 41: 193-196, 2008.
- DIAS, J. C. P.; MACÊDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.
- 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 *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-14, 2009.
- DONG, C. T<sub>H</sub>17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nature Immunology. v.8, 2008.
- DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104(Suppl. I): 259-262, 2009.
- DRIGO, S. A.; et. al. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha polymorphism with Chagas disease in Brazilian patients. Immunol Lett, v. 108, n. 1, p. 109-111, 2007.
- DUTHIE, M. S.; KAHN, S. J. NK cell activation and protection occur independently of natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. Int Immunol, v. 17, n. 5, p. 607-13, 2005.
- DUTRA, P. M. L.; COUTO, L. C.; LOPES, A. H. C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R.; Characterization of ecto-phosphatase activities of *Trypanosoma cruzi*: A comparative study between Colombiana and Y strains. Acta Tropica 100: 88-95, 2006.
- DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A. S.; VILLANI, F. N. A.; COSTA, G. C. C.; SILVEIRA, A. B. M.; REIS, D. A. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 208-218, 2009.
- EDWARD, J. T. Chem. Org. Sulfur. Comp. Eng. 2, 287. 1966.
- EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. Pharmacol. Ther., 99, p. 283-309, 2003.
- EVANS, H. G.; SUDDASON, T.; JACKSON, I.; TAAM, L. S.; LORD, G. M. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. PNAS. v.104, n. 43, 2007.
- FÁTIMA, A.; BAPTISTELLA, L. H. B.; PILLI, R. A.; MODOLO, L. V. Sialic acids – from the comprehension of their involvement in biological processes to antiinfluenza drug design *Quím. Nova* vol.28 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2005.

FERREIRA, M. U. et al. Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana. 1 ed. Barueri, SP: editora Manole LTDA, 2003.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C. & BAENA, M. Synonymy of the reduviid (hemiptera: heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670: 1-12, 2004.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Programa Integrado de Doença de Chagas da Fiocruz. Portal Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2007. Disponível em : [www.fiocruz.br/chagas](http://www.fiocruz.br/chagas). Acesso em: 14 out.2009.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14, 1237–1266, 2007.

GALVÃO, C. & ÂNGULO, V. M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, colômbia. *Zootaxa*, 1.241:61-68, 2006.

GARDINER, D. L.; TRENHOLME, K. R.; SKINNER-ADAMS, T. S.; STACK, C. M.; DALTON, J. P. Overexpression of leucyl aminopeptidase in *Plasmodium falciparum* parasites. Target for the antimalarial activity of bestatin. *J. Biol. Chem.*, 281, p. 1741-1745, 2006.

GASCON, T. et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in áreas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista Espanola de Cardiologia*, 60: 285-293, 2007.

GAVIGAN, C. S.; DALTON, J. P.; BELLA, A. The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 117, p. 37-48, 2001.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, P.; HIENV, L.; SHER, A. The microbial activity of IFN-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- $\beta$ . *Eur J Immunol.* 22: 2501-2506, 1992.

GELLER, M. et al. Serum IgE levels in Chagas' disease. *Clin Allergy*, v. 8, p. 383-385, 1978.

GELLER, M.; GRELLER, M. Documentação brasileira sobre a ausência de elevação de IgE sérica total em infecção por protozoário. *JBM*, v. 78, n. 5, p. 106-108, 2000.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R.; SCHREVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J.M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in monphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J. Biol. Chem.*, 276, p. 47078-47086, 2001.

GOLDEN, J. M; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokines effects on macrophage trypanocidal activity, *Exp Parasitol*, v.72, p. 391-402, 1991.

- GUHL, F.; JARAMILLO, C.; VALLEJO, G. A.; CARDENAS-ARROYO, F.; AUFDERHEIDE, A. Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 553-555, 2000.
- GURTLE, R. E. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz, RJ*, v. 104 (suppl.I): 52-59, 2009.
- GUTIERREZ, F. R. S.; MINEO, T. W. P.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 104(Suppl. I): 236-245, 2009.
- GUTIERREZ, F. R.; LALU, M. M.; MARIANO, F. S.; MILANEZI, C. M.; CENA, J.; GERLACH, R. F.; SANTOS, J. E.; TORRES-DUENAS, D.; CUNHA, F. Q.; SCHULZ, R.; SILVA, J. S. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 197: 1468-1476, 2008.
- HANKINS, E. G.; GILLESPIE, J. R.; AIKENHEAD, K.; BUCKNER, F. S. Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 144, p. 68-75, 2005.
- HERRERO, C.; HU, X.; PING LI, W.; SAMUELS, S. I.; SHARIF, M. N.; KOTENKO, S.; IVASHKIV, L. B. Reprogramming of Signaling of IL-10 Activity and by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 171:5034-5041, 2003.
- HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature*, v. 212, p. 1385-1386, 1966.
- HOFT, D. F.; SCHNAPP, A. R.; EICKHOFF, C. S.; ROODMAN, S. T. Involvement of CD4<sup>+</sup> Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 68, p. 197-204, 2000.
- HOFT, D. F & EICKHOFF, C. S. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun.* 70: 6715-6725, 2002.
- INFANTE-DUARTE, C; HORTON, H. F; BYRNE, M. C; KAMRADT, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in TH cells. *J. Immunol.* 165, 6107-6115 2000.
- KAMANAKA, M.; KIM, S. T.; WAN, Y. Y.; SUTTERWALA, F. S.; LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E.; HARHAJ, E.; FLAVELL, R. A. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immun* 25: 941-952, 2006.
- KERR, J. F. R; WYLLIE, A. H; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.
- KLASON, P.; *Chem. Ztg.* 14,543, 1890.

KORHONEN, R.; KOSONEN, O.; HÄMÄLÄINEN, M.; MOILANEN, E. Nitric Oxide-Releasing Compounds Inhibit the Production of Interleukin-2, -4 and -10 in Activated Human Lymphocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103:322–328, 2008.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 16, 3-11, 2009.

KROPF, S. P et al. Doença de Chagas: A construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, RJ: v. 5, n. 2, p. 347-365, ago. 2000.

KÜSTERS, S.; GANTNER, F.; KÜNSTLE, G.; TIEGS, G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A. *Gastroenterol* 111: 462–471, 1996.

LA CAVA, A. Natural Tregs and autoimmunity. *Frontiers in Bioscience* 14:333-343, 2009.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*, v. 163, p. 123-520, 1979.

LIEKE, T.; GRAFEE, S. E.; KLAUENBERG, U. et al. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun*, v.72, p. 6.817-6.825, 2004.

LÓPEZ, C. A.; TRIGO, G. *Advances in Heterocyclic Chemistry*. 38, 177, 1985.

LOPEZ-VELAZQUEZ, G. et al Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal*, v. 11, n. 4, p. 293-299, 2005.

MARIANO, F. S; GUTIERREZ, F. R; PAVANELLI, W. R; MILANEZI, C. M; CAVASSANI, K. A; MOREIRA, A. P; FERREIRA, B. R; CUNHA, F. Q; CARDOSO, C. R; SILVA, J. S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 10: 825-833, 2008.

MATTEI, D. M. et al. Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonuclease cleavage of kinetoplast-DNA. *FEBS Letters*, v. 74, p. 264-268, 1977.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146. 601–620, 2007.

MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104(Suppl. I): 263-269, 2009.

- MINOPRIO, P. M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPÉRIO, L. M. R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I Quantification of both T-and B-cell response. *Scand J Immunol.* 24: 661 – 668, 1986.
- MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol*, v. 31, p. 588-591, 2001.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142, 1991.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin América and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz, RJ*, v. 104: 17-30, 2009.
- MOORE, K. W.; WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683–765, 2001.
- MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Approaches for the Development of New Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. *Current Drug Target*, 10, 212-231, 2009.
- MORTARA, R. A. et al. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc*, v.77, n. 1, p. 77-94, 2005.
- MORTY, R. E.; FULOP, V.; ANDREWS, N. W. Substrate recognition properties of oligopeptidases B from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*; 184, p. 3329-3337, 2002.
- MURPHY, M. L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 31:2848–2856, 2001.
- NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8841-8848, 2000.
- O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T<sub>H</sub>1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Immunology*. v.7, 2007.
- OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. B. P.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas Structure, reactivity, and biological properties of hidantoine. *Quím. Nova* v.31, n. 3, 2008.
- OLIVEIRA, M. A.; SANTIAGO, H. C.; LISBOA, C. R.; CERAVOLLO, I. P.; TRINCHIERI, G.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. *Leishmania* sp.: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. *Exp Parasitol.* 95: 96-105, 2000.
- PACKARD, K. A.; KHAN, M. M. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol* 3: 909-920, 2003.

PARODI, C.; PADILLA, A. M.; BASOMBRÍO, M. A. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 288-294, 2009.

PATTERSON, J. S.; BARBOSA, S. E.; FELICIANGELI, M. D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. Acta Trop 110: 187-199, 2009.

PENA, S. DJ.; MACHADO, C. R.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 108-114, 2009.

PEREIRA, V. R. A.; LORENA, V. M. B.; GALVÃO DA SILVA, A. P.; COUTINHO, E. M.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; MIRANDA, P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; SOARES, M. B. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. Parasitol 129:563-570, 2004.

PIACENZA, L; PELUFFO, G; RADI, R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. Proc Natl Acad Sci USA 98: 7301-7306, 2001

PICCIRILLO, C. A. Regulatory T cells in health and disease. Cytokine 43: 395-401, 2008.

PINTO, A. Y. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41 (6): 602-614, 2008.

PLATA, F. et al. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. Ann Inst Pasteur/Immunol, v.138, p.397-415, 1987.

POWRIE, F.; COFFMAN, R. L. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention, Immunol Today, v. 14, p. 270-274, 1993.

RAETHER, J.M.; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol res, v. 90 Supp 1, p. S19-39, 2003.

RASSI, A. JR; RASSI, A; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 152-158, 2009

REED, S. G. In vivo administration of recombinant INF-gamma induces macrophages activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 140: 4342-4347, 1988.

REED, S. G. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol, v. 153, p. 3.135.140, 1994.

REIS, G. A & LOPES, M. F. A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M.

*Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 153-169, 2000.

RIBEIRO, J. M. & FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual review of Entomology*, 48: 73-88, 2003.

RODRIGUEZ, A.; RIOULT, M. G.; ORA, A.; ANDREWS, N. W. A Trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.*, 129, p. 1263-1273, 1995.

ROMAGNANI, S. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends Microbiol* 4:470–473, 1996.

SACKS, D; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*.v. 3, n. 11. 2002.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562, 2004.

SATHLER-AVELAR, R; LEMOS, E. M; REIS, D. D; MEDRANO-MERCADO, N; ARAÚJO-JORGE, T. C; ANTAS, P. R; CORRÊA-OLIVEIRA, R; TEIXEIRA-CARVALHO, A; ELÓI-SANTOS, S. M; FAVATO, D; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 58: 655-663, 2003.

SATHLER-AVELAR, R; Vitelli-Avelar, D. M; Teixeira-Carvalho, A; Martins-Filho, O. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104(Suppl. I): 246-251, 2009.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M.; LIMA, A. P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. *J Exp. Med.* 192, p. 1289-1300, 2000.

SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 (supp I), p. 51-63, 1999.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leuk Biol* 75:163-189, 2004.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* 10:385–409, 1992.

SILVA, J. S. et. al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). *J Exp Med*, v. 174, p. 539-544, 1991.

SILVA, J. S. et. al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*, v.175, p. 169-173, 1992.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. *Moléstia de Chagas*. 2. ed. RJ: Editora Rubio, 2007.

SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 13: 105-121, 2009.

TAKENO, M. et al. Chronic Chagas' heart disease in a Japanese-Brazilian traveler: a case report. *Japanese Heart Journal*, 40 (3): 375-382, 1999.

TATTO, E. et al. Acute Chagas disease outbreak related to sugar cane drunk in Santa Catarina State, south Brasil. In: MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, 56, 4-8 nov. 2007, Philadelphia. Abstract, 2007.

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico São paulo: Atheneu; 2006.  
TAYLOR-ROBINSON, A. W.; LIEW, F. Y.; SEVERN, A.; XU, D.; MCSORLEY, S. J.; GARSIDE, P. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type I and T helper type II cells. *Eur J Immunol* 24:980-984, 1994.

TEIXEIRA. Doença de Chagas e evolução. Brasília: Editora Universidade de Brasília: Finattec, 2007.

TODOROV, A. G.; ANDRADE, D.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, RDEC.; BADER, M.; STEWART, J.; GERA, L.; MULLER-ESTERL, W.; MORANDI, V.; GOLDENBERG, R. C.; NETO, H. C.; SCHARFS-TEIN, J Trypanosoma cruzi induces edematogenic response in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *Faseb J.*, 17, p. 73-75, 2003.

TORRICO, F; HEREMANS, H; RIVERA, M. T; VAN MARCK, E; BILLIAU, A; CARLIER, Y. Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. *J. Immunol.* 146:3626-3632, 1991.

TRAPANI, S.; LINSS, J.; GOLDENERBRG, S.; FISCHER, H.; CRAIEVICH, A. F.; OLIVA, G. Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from Trypanosoma cruzi at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 313, p. 1059-1072, 2001.

UMEZANA, E. S. et. al. Trypanosoma cruzi: different surface antigens of trypomastigotes are targets of lytic antibodies. *Acta Trop.*, v. 54, p. 41-53, 1993.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.*, 8, p. 287-295, 2002.  
URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 311-318, 2009.

VAN HELLEMOND, J. J.; OPPERDOES, F. R.; TIELENS, A. G. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in Trypanosoma brucei. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 967-971, 2005.

VAN ZANDBERGEN, G; BOLLINGER, A; WENZEL, A; KAMHAWI, S; VOLL, R; KLINGER, M; MÜLLER, A; HÖLSCHER, C; HERRMANN, M; SACKS, D; SOLBACH,

W; LASKAY, T. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13837-13842, 2006.

VITELLI-AVELAR, D. M; SATHLER-AVELAR, R; MASSARA, R. L; BORGES, J. D; LAGE, P. S; LANA, M; TEIXEIRA-CARVALHO, A; DIAS, J. C; ELÓI-SANTOS, S. M; MARTINS-FILHO, O. A. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25High T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol* 145: 81-92, 2006.

WAGHABI, M. C. et. al. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*, v. 7, n. 4, p. 511-517, 2005.

WARE, E.; *Chem. Rev.* 1950, 46, 403.

WHO - World Health Organization 2002. Control of Chagas Disease, WHO Technical series 905, Geneva, p. 96.

WILSON, L. S.; STROSBERG, A. M.; BARRIO, K. Cost-effectiveness of Chagas disease interventions in Latin America and the Caribbean: Markov models. *Am J Trop Med Hyg* 73: 901-910, 2005.

XAVIER, S. S. et al. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop*, v. 39, n. 2, p. 211-216, 2006.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 101-107, 2009.

ZONG, W. X; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20 (1)1-15. 2006.



