



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e**  
**Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DERIVADO DE  $\beta$ -**  
**LAPACHONA R72 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE**  
***Trypanosoma cruzi* E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO**  
***T. cruzi* IN VITRO**

**DANIELLE OLIVEIRA DOS ANJOS**

**Salvador-Bahia**

**2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e**  
**Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DERIVADO DE  $\beta$ -**  
**LAPACHONA R72 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE**  
***Trypanosoma cruzi* E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO**  
***T. cruzi* IN VITRO**

**DANIELLE OLIVEIRA DOS ANJOS**

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabricio Rios dos Santos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa para a obtenção de grau de  
Doutor.

**Salvador-Bahia**

**2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Anjos, Danielle Oliveira dos  
A599a Avaliação do efeito do composto derivado de  $\beta$ -lapachona R72 em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi in vitro*/ Danielle Oliveira dos Anjos. - 2014.  
99 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Biologia Parasitária.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Ultraestrutura. 2. Quimioterapia. I.Título.

CDU 616.937

"AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DERIVADO DE B-LAPACHONA R72 EM FORMAS  
TRIPOMASTIGOTAS DE TRYPANOSOMA CRUZI E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO T.  
CRUZI IN VITRO."

DANIELLE OLIVEIRA DOS ANJOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria de Nazaré Souza  
Professora Titular  
IOC/FIOCRUZ



Dra. Simone Garcia Macambira  
Professora adjunta  
UFBA



Dra. Sônia Gomes Andrade  
Pesquisadora  
CPqGM/FIOCRUZ

Ao meu Deus que é o meu refúgio, a minha fortaleza e nele confiarei sempre. Ao meu esposo Raildo e a minha filha Larissa, pelo incentivo constante, por me fazer acreditar que era possível e por ter trilhado comigo de mãos dadas. Muito obrigada, eu amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ter me concedido a vida e por ser a minha rocha e minha fortaleza.

Ao meu orientador Dr. Marcos André Vannier dos Santos pela orientação, dedicação e confiança.

Ao programa de Pós-Graduação e ao CPqGM-FIOCRUZ/BA por ter permitido a realização desse curso.

A FAPESB pela concessão da bolsa de estudos.

A essas três pessoas: Fabricio Rios Santos, George Rego Albuquerque e Ana Lucia Matos, vocês foram muito importantes para o início das atividades do projeto. Agradeço a vocês por todo apoio, carinho e atenção. Sei que pude contar com vocês durante todo tempo. Muito obrigada!

Aos professores/pesquisadores do Curso de Pós-Graduação pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Aos meus, pais Regis José Barbosa dos Anjos e Antonilda de Oliveira dos Anjos, por terem sempre me apoiado e incentivado, muito obrigada, eu amo vocês.

Aos professores da UESC: Silva Carvalho, Roberto Paixão, Amauri, Alexandre Munhoz, Bianca e Roueda por todo apoio e em especial agradeço a George Rego Albuquerque por me aceitar em seu laboratório, sei que pude contar com você em todos os momentos. Sempre disposto a ajudar.

A todos os colegas do hospital de Medicina veterinária da UESC em especial a Roney Guimarães, Luana, Fabiana, Daniela Rocha, Fabio e Rodrigo.

Ao meu esposo Raildo Mota de Jesus, pelo apoio, confiança e incentivo a cada dia, por ter entendido nos momentos difíceis.

Agradeço a minha filha Larissa pela alegria que ela me dá.

A todos os meus familiares e especial a minha irmã Milane e minha prima Wel.

Aos meus sobrinhos: Alice Silva, Julia Viana, Marcel, Alice Santana, Rhuam, Maria Clara, João, Ana Luiza, Luiza e Luan, pela alegria que vocês me dão.

À minha sogra e aos meus cunhados por terem me ajudado nessa trajetória.

Ao amigo Cláudio Pereira pela amizade, carinho e ajuda prestada.

A todos os amigos do laboratório Biomorfologia Parasitária: Ana Lucia Matos, Edson, Carla, Eliete, Anderson, Alene Vanessa, Tayane, Gustavo, Rafael Gomes, Otávio, Diego, Ana Márcia, Mariana e Mara e meu agradecimento em especial a Karla Graziela, pelo carinho, amizade e dedicação.

A toda equipe da microscopia eletrônica do Centro de pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) em especial a Dra. Adriana Lanfredi Rangel, ao Dr. Claudio Pereira e a Dra. Lucia pela atenção, gentileza, paciência e toda ajuda prestada

A toda equipe da microscopia eletrônica da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em especial a Dr. Pedro Mangabeira, Dr. Eduardo Grós, Patricia, Lucas D. Jaci, Lane, Taís, Valéria e José, os 2 últimos não estão mais na microscopia, mais me ajudaram muito quando estavam trabalhando no Centro de microscopia.

A toda equipe do laboratório de imubiologia da UESC: Aos professores, Rosana, Aline conceição, Tania Barth, Izaltina Jardins e em especial a Jane Lima dos Santos, uma pessoa muito especial, sei que pude contar com você todas as vezes que precisei. Aos colegas, Cilene, Nailma, Juliana, Simone, Mylene, Kamila, Ana Clara, Rose, Vanessa e Sandro.

A toda equipe do LETI em especial a Cassio Santana e Tanira Matutino pela amizade, carinho e ajuda prestada durante o curso. Muito obrigada!

A toda equipe do LBPI pela ajuda, sempre que eu solicitei.

A toda equipe do LACEI e em especial a: Dra. Sonia Gumes Andrade, Dra. Renata Siqueira Portela, Dr. Marcos Lázaro e ao doutorando Marcio Cerqueira pela amizade, carinho e ajuda prestada durante o curso.

A todos do CBG ao Professor Dr. Marco Antonio e Rhodolfo pela ajuda no microscópio de fluorescência.

A ex-secretaria da pós-graduação Taise e Mara (atual) pela cordialidade no atendimento.

Ao professor Dr. Marcelo e ao doutorando Thalís da UESC, pela ajuda na citometria de fluxo e, da Fiocruz, a Jorge Clarêncio, Liliane, Raimundo e Myceli pela dedicação e ajuda nas leituras no FACS.

Ao pessoal da biblioteca da UESC e do CPqGM, em especial, a D. Ana Fiscina, Eliana e Val pela presteza sempre que solicitados.

A todas minhas amigas de oração, em especial a Lílivia Lima Ferreira, Claudinha e Ritinha.

ANJOS, Danielle Oliveira dos. Avaliação do efeito do derivado de  $\beta$ -lapachona R72 em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi in vitro*. 99 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

A tripanossomíase americana também conhecida como doença de Chagas é um importante problema de saúde pública, uma doença de origem parasitária que afeta 8 milhões de pessoas na América Latina (OMS, 2013). Atualmente existem apenas dois fármacos utilizados na prática clínica: o benzonidazol e o nifurtimox. Esse último não é usado no Brasil. Esses fármacos apresentam efeitos colaterais e são confrontados com cepas resistentes (FILARDI e BRENER, 1987; MEJIA et al., 2012). Desta forma, torna-se necessária a busca de compostos que apresentem maior eficácia e menor toxicidade. No presente trabalho foi avaliado o efeito do composto derivado de  $\beta$ -lapachona, R72, em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e em macrófagos infectados *in vitro*. Observamos que a R72 reduziu, significativamente ( $p < 0,05$ ), o número de parasitos viáveis, produzindo  $IC_{50}$  de 15  $\mu$ M. A análise ultraestrutural revelou que a R72 causou danos na bolsa flagelar, cinetoplasto e mitocôndrias. Além disso, encontramos a presença de corpúsculos lipídicos e figuras de mielina no citoplasma do protozoário, indicando processos de autofagia, a qual foi confirmada pela sonda MDC. A análise por citometria de fluxo indicou morte por apoptose, necrose e produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o composto não apresentou toxicidade para células de mamíferos em concentrações inferiores a 200  $\mu$ M. A R72 reduziu, significativamente, a porcentagem de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* e o número de parasitos por macrófagos. Verificamos inibição da internalização de parasitos quando os macrófagos foram tratados previamente com o composto R72. Análise ultra-estrutural evidenciou um processo de autofagia caracterizado pela presença de vacúolo autofágico e formação de corpúsculos lipídicos. O mecanismo envolvido na formação de vacúolos autofágicos e corpúsculos lipídicos é independente da produção de óxido nítrico. Esses resultados ajudam a elucidar os mecanismos de ação de fármacos potenciais para a quimioterapia da doença de Chagas.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, ultraestrutura, quimioterapia.

ANJOS, Danielle Oliveira dos. Evaluation of effects of R72  $\beta$ -lapachone derivate compound and in tripomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* and infection macrophage by *T. cruzi in vitro*. 99 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

The American trypanosomiasis also known as Chagas disease is a major public health problem, a parasitic disease caused that affects 8 million people in Latin America (OMS, 2013). Currently there are only two drugs used in clinical practice: the benznidazole and the nifurtimox. The latter is not used in Brazil. These drugs are faced with considerable side effects and resistant strains (FILARDI e BRENER, 1987; MEJIA et al., 2012). Thus the search for drugs effective in the chronic phase of the disease and lower toxicity is required. In this study the effect of the  $\beta$ -lapachone derivative R72 in trypomastigote forms of *T. cruzi* and upon the infection of macrophage by *T. cruzi in vitro*. We observed that the R72 significantly inhibited ( $p < 0,05$ ) the number of viable parasites, producing  $IC_{50}$  of 15  $\mu$ M. The ultrastructural analysis by transmission electron microscopy revealed that the R72 has caused damage to the flagellar pocket, kinetoplast and mitochondria. Furthermore, we found the presence of lipid bodies and myelin figures in the cytoplasm of the protozoan indicating autophagic process, which was confirmed by the MDC probe. Analysis by flow cytometry indicated death by apoptosis and necrosis and production of reactive of reactive oxygen species. Furthermore, the compound did not show toxicity to mammalian cells at concentrations below 200  $\mu$ M. The R72 significantly reduced the percentage of infected macrophages and the number of number of *T. cruzi* parasites per macrophage. We observed inhibition of internalization of parasites when macrophage were pretreated with the compound R72. Ultrastructural analysis revealed a process of autophagy characterized by the presence of autophagic vacuoles and lipid body formation. The mechanism involved in the formation of autophagic vacuoles and lipid body is independent of nitric oxide. These results help elucidating the mechanisms action of potential drugs and provide new tools for chemotherapy of Chagas disease.

**Word-key:** *Trypanosoma cruzi*, ultrastructure, chemotherapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias de migração da América Latina (área endêmica) e estimativa do número de pessoas infectadas em países considerados não endêmicos (Estados Unidos e Canadá, Europa, Japão e Austrália).....	17
Figura 2.	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> mostrando as diferentes formas evolutivas do parasito nos hospedeiros invertebrado e vertebrado (tecido).	18
Figura 3.	Estruturas moleculares dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas .....	25
Figura 4.	Estrutura molecular das naftoquinonas. Em (A) lapachol e em (B) $\beta$ -lapachona .....	30
Figura 5.	Efeito tripanocida de compostos derivados de $\beta$ -lapachona em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 6.	Efeito inibitório da R72 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , em diferentes concentrações.....	48
Figura 7.	Avaliação da citotoxicidade em formas tripomastigotas <i>T. cruzi</i> , pelo método do MTT.....	49
Figura 8.	Microscopia eletrônica de varredura de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	50
Figura 9.	Efeito do composto R72 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de incubação.....	52
Figura 10.	Efeito do composto R72 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de incubação.....	53
Figura 11.	Efeito do composto R72 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	54
Figura 12.	Microscopia de fluorescência de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento com o composto R72.....	55
Figura 13.	Análise quantitativa por microscopia de fluorescência de tripomastigotas positivos para a sonda MDC após o tratamento com o composto R72 por 24 horas.....	55
Figura 14.	Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com o composto R72 por 24 horas e incubados com anexina V e iodeto de propídio e quantificados por citometria de fluxo .....	56
Figura 15.	Microscopia de fluorescência de tripomastigotas tratados com o composto R72 a 15 $\mu$ M após 24 horas.....	57
Figura 16.	Quantificação da produção de ERO por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento com 15 $\mu$ M de R72 e 30 minutos com DHE.....	58

Figura 17.	Avaliação da viabilidade celular em culturas de células de mamíferos pelo método do MTT, determinado a 570 nm após 24 horas de incubação com o composto R72 em diferentes concentrações.....	59
Figura 18.	Efeito do composto derivado de $\beta$ -lapachona R72 na interação parasito/macrófago.....	61
Figura 19.	Efeito do composto derivado de $\beta$ -lapachona R72 na interação parasito/macrófago.....	61
Figura 20.	Fotomicrografias da interação parasitos/macrófagos.....	62
Figura 21.	Índice de adesão e internalização em macrófagos tratados previamente a interação com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	63
Figura 22.	Microscopia eletrônica de varredura de macrófagos tratados e infectados com <i>T. cruzi</i> .....	64
Figura 23.	Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos incubados com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados por 24 horas com a R72 a 50 $\mu$ M....	66
Figura 24.	Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos incubados com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados por 72 horas com a R72 a 50 $\mu$ M....	67
Figura 25.	Produção de NO por macrófagos J774.....	68
Figura 26.	Produção de NO na infecção parasito/macrófagos J774.....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP	Monofosfato de adenosina
ANEXINA V-FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CL	Corpúsculo lipídico
DAB	1,4-diamino-2-butanona
DHE	Dihidroetídio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FACS	Separação de células por ativação de fluorescência
HE	Hematoxilina/Eosina
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
IFN - $\gamma$	Interferon- $\gamma$ (gama)
IP	Iodeto de propídio
IS	Índice de seletividade
LPS	Lipopolissacarídeo
MDC	Monodansilcadaverina
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MTT	3-(4, 5-Dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolium brometo tetrazol
NEED	Diamina - dihidroclorido naftaleno
NHEPACHA	(Nuevas Herramientas para el Diagnóstico y la Evaluación del Paciente con Enfermedad de Chagas/Novas ferramentas para o diagnóstico e avaliação de pacientes com a doença de Chagas),
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PBS	“phosphate buffered saline” Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
VA	Vacúolo autofágico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS.....	14
1.2	O CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
1.2.1	Interação de <i>Trypanosoma cruzi</i> com a célula hospedeira.....	19
1.3	A DOENÇA DE CHAGAS.....	22
1.4	TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	24
1.5	A $\beta$ -APACHONA.....	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	35
4.1	COMPOSTOS TESTADOS.....	35
4.2	ANIMAIS.....	35
4.3	OBTENÇÃO E CULTIVO DE MACRÓFAGOS.....	35
4.3.1	Macrófagos peritoneais.....	35
4.3.2	Macrófagos J774.....	36
4.3.3	Obtenção de esplenócitos.....	36
4.4	OBTENÇÃO E CULTIVO TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	37
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE $\beta$ -LAPACHONA SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	37
4.6	MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA.....	38
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	38
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	39
4.8.1	Microscopia eletrônica de transmissão.....	39
4.8.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	40
4.9	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO EM DIFERENTES TIPOS DE MORTE CELULAR.....	40
4.9.1	Autofagia.....	40
4.9.2	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por microscopia de fluorescência.....	41
4.9.3	Citometria de fluxo .....	41
4.9.3.1	Avaliação de apoptose e/ou necrose.....	41

4.9.3.2	<i>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio</i> .....	42
4.10	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO R72 EM CULTURAS DE ESPLÊNOCITOS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	42
4.11	AVALIAÇÃO DO COMPOSTO NA INTERAÇÃO PARASITO-MACRÓFAGO.....	43
4.11.1	Avaliação da atividade do composto R72 sobre a capacidade fagocítica de macrófagos.....	43
4.11.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA INTERAÇÃO PARASITO-MACRÓFAGO .....	44
4.11.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	44
4.11.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i> .....	45
4.11.3	Quantificação da produção de óxido nítrico por macrófagos.....	45
4.11.4	Análise estatística.....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47
5.1	TRIAGEM DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE $\beta$ -LAPACHONA NAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	47
5.2	DETERMINAÇÃO DA IC <sub>50</sub> EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	48
5.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	49
5.4	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA R72 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	50
5.5	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA R72 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	51
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO NA AUTOFAGIA.....	54
5.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO NA APOPTOSE E/OU NECROSE.....	56
5.8	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	57
5.9	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE EM CULTURAS DE ESPLÊNOCITOS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	58
5.10	EFEITO DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS PELO <i>T. cruzi</i> .....	60
5.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPOSTO R72 EM MACRÓFAGOS ANTES DA INTERAÇÃO COM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....	63

5.12	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA R72 NA INTERAÇÃO PARASITO-MACRÓFAGO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	65
5.13	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA INTERAÇÃO PARASITO-MACRÓFAGO E POR MACRÓFAGOS J774.....	67
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	70
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública, uma doença de origem parasitária que afeta mais de 80 mil pessoas na América do Norte e Europa (COURA e VIÑHAS, 2010) e cerca de 8 milhões de pessoas nas Américas do Sul e Central (OMS, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente são relatadas aproximadamente 21 mil mortes associadas à doença (OMS, 2013). Estima-se que no Brasil cerca de 5 a 6 milhões de pessoas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, havendo aproximadamente seis mil óbitos por ano associados à doença (SILVEIRA, 2000). Segundo Gonçalves et al. (2007), a doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças parasitárias, sendo a faixa etária, acima de 45 anos, a mais atingida no Brasil.

O Brasil recebeu, em 2006, da Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS), um certificado de erradicação do principal vetor domiciliar da doença de Chagas, o *Triatoma infestans*. Entretanto, outras espécies de triatomíneos silvestres se adaptam bem às moradias, atraídos pela iluminação destas e são importantes vetores de *T. cruzi*.

Nos últimos 18 anos, vetores da espécie *Triatoma tibiamaculata* foram encontrados em residências de moradores da cidade de Salvador/Bahia (DIAS-LIMA e SCHERLOCK, 2000). Esse vetor, que é bem característico de ambiente silvestre, vem ganhando espaço em áreas domiciliares e torna-se um importante vetor da doença de Chagas. Contudo, estudos realizados por Ribeiro-Junior, 2006 demonstraram a ocorrência de 40 triatomíneos da espécie *Triatoma tibiamaculata* próximos a remanescentes florestais de Salvador/Bahia. Essas espécies foram coletadas ou levadas espontaneamente pela população para o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM (DIAS-LIMA e SCHERLOCK, 2000; RIBEIRO-JUNIOR, 2006; DIAS, 2007).

Em novembro de 2008 foi divulgada pela mídia a captura de 400 triatomíneos desta espécie na região da paralela em Salvador/Bahia, sendo que 50% deles estavam infectados pelo *T. cruzi*. Esses dados reforçam o risco de se adquirir a doença de Chagas através de vetores que são considerados de ambiente silvestre. Tal possibilidade já havia sido aventada previamente em estudo realizado pela FIOCRUZ/BA (DIAS e SCHERLOCK, 2000; RIBEIRO-JÚNIOR, 2006).

Embora a transmissão vetorial da doença de Chagas, pelo vetor (*Triatoma infestans*), tenha sido controlada em 11 estados do Brasil, outros vetores e outras vias de contaminação, como por exemplo, a transmissão oral, podem ser responsáveis por novos casos de infecção. Apesar de alguns pesquisadores como Camandaroba et al. (2002) e Barbosa (2006), terem estudado a forma de transmissão oral em animais experimentais, essa forma de transmissão era pouco conhecida ou divulgada. E recentemente a transmissão da doença de Chagas através de alimentos contaminados foi amplamente divulgada, por jornais, televisão, pela secretaria de vigilância sanitária (SVS) e também pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA).

Em 2005 foram relatados em Santa Catarina, 24 casos de pessoas com esta doença após ingerir caldo de cana contaminado pelo *T. cruzi*, sendo que destas, três pessoas foram a óbito (STEINDEL et al., 2005; BRASIL, 2007). Na região Norte foi registrado 100 casos de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, todas associadas ao consumo de suco fresco de açaí (BRASIL, 2008; ANVISA, 2008; NOBREGA et al., 2009).

Andrade et al. (2011) realizaram um estudo biológico, bioquímico e molecular das cepas *T. cruzi* que foram isoladas dos pacientes durante um surto de infecção oral no estado de Santa Catarina em 2005, e classificou de acordo com o novo consenso como todas pertencentes ao biotipo tipo II. Foram demonstradas por Andrade (1974) e Andrade et al. (1985), as diferenças entre os biotipos (grupos de cepas do *T. cruzi*) e as respostas aos quimioterápicos pelas cepas tipo I, II e III. Na infecção com o biotipo tipo I (cepa Y) de *T. cruzi* verificou-se elevado macrofagotropismo, alta virulência com pico parasitemico do 7º ao 12º dia e alta suscetibilidade ao tratamento com o benzonidazol e o

nifurtimox, enquanto que na infecção com o biotipo tipo II (cepa 21 SF, Peruana) observou-se curso parasitêmico mais lento e tropismo pelo miocárdio na fase aguda da infecção. Já as cepas do biotipo tipo III (cepa Colombiana) é altamente resistente ao tratamento, sendo que a parasitemia evolui lentamente atingindo níveis elevados aos 30 dias e apresenta um nítido miotropismo com envolvimento de músculos esqueléticos (ANDRADE et al., 1985).

Atualmente a nomenclatura para cepas de *T. cruzi* devem ser classificadas em 6 DTUs (Discrete Typing Units), (*T. cruzi* I-VI), de acordo com esse novo sistema de classificação as cepas Y e Peruana estão no grupo de *T. cruzi* II (TcII) e a cepa colombiana no grupo de *T. cruzi* I (TcI) (ZINGALES et al., 2009).

Estes estudos são importantes para identificar o tipo de cepa, direcionar o tratamento dos pacientes, ajudar no entendimento do curso da infecção e a resposta aos quimioterápicos, visto que esta doença vem assumindo importante relevância nas diferentes formas de transmissão.

Uma vez ocorrida a adaptação entre parasito e hospedeiro, outras formas de transmissão são consideradas secundárias, como por exemplo, acidentes laboratoriais, a transmissão congênita, a transmissão por via oral através de alimentos contaminados pelo *T. cruzi* e a transfusão de sangue (VINHAES et al., 2000; DIAS, 2000). Contudo, o aumento de indivíduos infectados com o *T. cruzi* em áreas endêmicas gera preocupação devida à migração desses indivíduos para países onde a doença não existia Coura e Viñas (2010), tornando-se necessária uma avaliação médica e social de pessoas infectadas para países não endêmicos, devido à possibilidade de transmissão através de transfusões de sangue (RIBEIRO et al., 2012). Na Figura 1 estão representados os países que apresentam números alarmantes de pessoas infectadas com o *T. cruzi*. Esses países eram considerados como países de áreas não endêmicas da doença de Chagas (COURA e VIÑAS, 2010).

Assim, essa doença continua sendo um importante problema de saúde pública, visto que a tendência de surgimento de novos casos tanto em áreas

endêmicas como não endêmicas é uma realidade visível nas diferentes formas de transmissão.

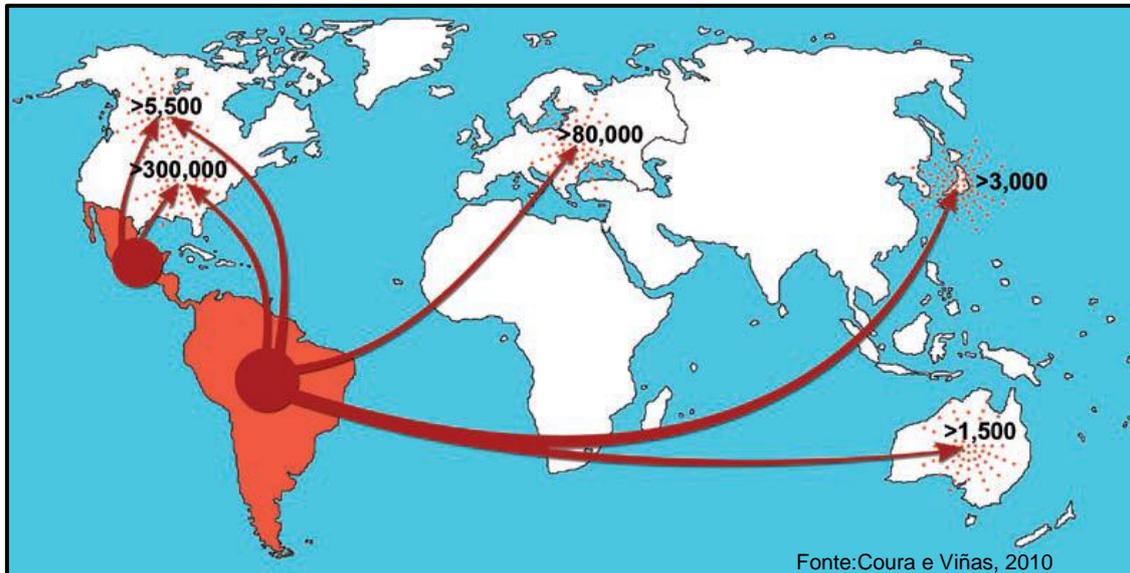


Figura 1. Vias de migração da América Latina (área endêmica) e estimativa do número de pessoas infectadas em países considerados não endêmicos (Estados Unidos e Canadá, Europa, Japão e Austrália).

## 1.2 O CICLO BIOLÓGICO DO *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas. Este parasito pertence ao filo Protozoa, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*.

O ciclo do *Trypanosoma cruzi*, normalmente alterna o parasitismo entre um hospedeiro vertebrado, incluindo o homem e numerosas espécies de mamíferos terrestres ou arborícolas (que pode ser silvestre) e um vetor hematófago (hemípteros da família Reduviidae e subfamília Triatominae (Figura 2).

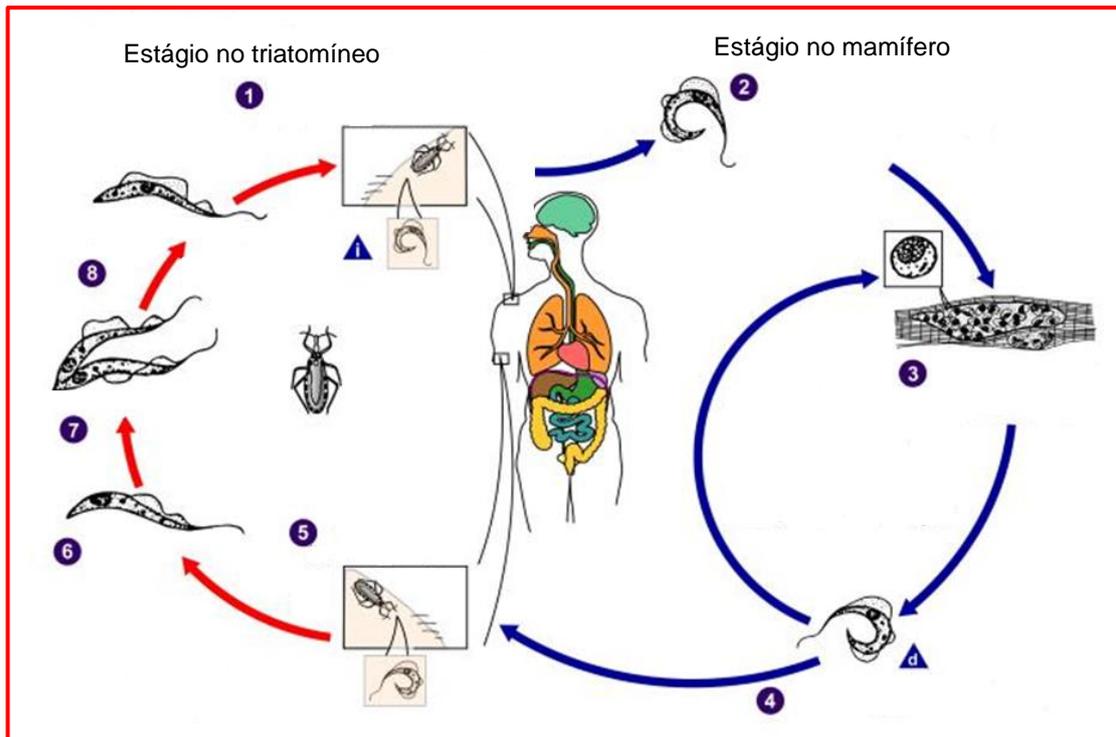


Figura 2. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* mostrando as diferentes formas evolutivas do parasito nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Em (1) no repasto sanguíneo o triatomíneo libera as fezes e urina com as formas tripomastigotas metacíclicas, as quais penetram na lesão ou em membranas mucosas como a conjuntiva; (2) Tripomastigotas metacíclicos penetram em diversos tipos de células e transformam-se em amastigotas; (3) Amastigotas multiplicam-se em células de tecidos infectados, e transformam-se em tripomastigotas, ocorre lise da célula parasitada e liberação de tripomastigotas no sangue, os quais podem infectar outras células, transformar-se em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção, manifestações clínicas podem resultar desse ciclo infeccioso; (4) Amastigotas intracelulares transformam-se em tripomastigotas e são liberados na corrente sanguínea; (5) Repasto sanguíneo (tripomastigotas sanguíneos são adquiridos); (6) Transforma-se em epimastigotas; (7) Ocorre multiplicação das formas epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; (8) As formas epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, os quais podem ser transmitidos em um novo repasto sanguíneo. Figura adaptada do Centro de Controle de doença de Chagas (CDC, 2013).

Na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* é encontrado na forma tripomastigota, a qual apresenta porção da mitocôndria localizada junto ao corpo basal do flagelo, apresentando grande concentração de DNA mitocondrial, cinetoplasto, localizado na porção posterior da célula. Esta forma não apresenta capacidade proliferativa, porém é infectante e pode invadir diferentes tipos celulares. Ao invadir a célula, esta forma se diferencia em amastigota, a qual apresenta um flagelo muito curto, geralmente restrito à própria bolsa flagelar e um cinetoplasto em forma de bastão junto à base do

flagelo. A amastigota é a forma proliferativa intracelular do *T. cruzi*, que se divide binariamente. Após vários ciclos de proliferação, essas voltam a forma tripomastigotas e provocam a ruptura celular, quando caem na corrente sanguínea podendo infectar outras células, repetindo este processo, ou serem captadas pelo vetor durante repasto sanguíneo (DE SOUZA, 2002).

No vetor, o ciclo do parasito começa quando este ingere formas tripomastigotas sanguícolas durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao intestino anterior, a forma tripomastigota sanguícola se transforma gradualmente na forma epimastigota, que se caracteriza pelo cinetoplasto justaposto à porção anterior do núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido (TYLER e ENGMAN, 2001; BURLEIGH e WOOLSEY, 2002).

No intestino médio começa a fase de replicação das formas epimastigotas, através de divisões binárias sucessivas (DE SOUZA, 2000). Em seguida, no intestino posterior ou reto, os epimastigotas evoluem para tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes que são expulsas com as dejeções do inseto no momento em que este faz novo repasto sanguíneo (BRENER et al., 2000).

### 1.2.1 Interação de *Trypanosoma cruzi* com a célula hospedeira

O processo de interação parasito-hospedeiro envolve muitas moléculas de reconhecimento e mecanismos distintos, tanto da célula hospedeira como do parasito (SCHENKMAN et al., 1988; MORTARA, 1991; CALER et al., 2001).

De acordo com Yoshida et al. (1990); Ramirez et al. (1993); Previato et al. (1994), as moléculas envolvidas neste processo de interação são glicoproteínas e proteínas (do tipo lectina) que estão presentes no parasito e na célula hospedeira. Essas moléculas presentes em ambos os componentes da interação, exercem papel essencial na fase inicial de adesão/ reconhecimento, invasão e sinalização (CORTEZ et al., 2003, MAEDA et al., 2012).

As moléculas envolvidas para o processo de interação presentes em *T. cruzi* e na célula-alvo variam de acordo com a forma do parasito e o tipo de célula em estudo. No parasito, algumas das moléculas importantes para o processo de adesão em células hospedeiras incluem as glicoproteínas do tipo gp82, gp35/50 e gp90 (YOSHIDA et al., 1990; RAMIREZ et al., 1993; PREVIATO et al., 1994). A gp82 é uma glicoproteína presente na forma tripomastigota metacíclica. Essa molécula é responsável pela mobilização do cálcio, que é necessário para o processo de invasão na célula-alvo (YOSHIDA, 2006; MAEDA et al., 2012). Favoreto e colaboradores em 1998 demonstraram que esta glicoproteína medeia a fosforilação da proteína tirosina-quinase, fosfolipase C e com consequente hidrólise de fosfatidilinositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), produzindo inositoltrifosfato e diacilglicerol, que são importantes para a cascata de sinalização durante o processo de invasão.

A glicoproteína gp35/50 semelhante a gp82 liga-se a receptores da célula de forma dependente e ativa a liberação de cálcio dos estoques intracelulares no entanto, a via de sinalização é dependente de AMP cíclico (AMPC) e de acidocalcissoma, organela que contém íons cálcio, manganês, sódio e zinco (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> e Zn<sup>2+</sup>) (DOCAMPO et al., 1995). Além desses íons esta organela ainda apresenta um sistema de antiporte Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> e fornece o Ca<sup>2+</sup> necessário para a sinalização do parasito no processo de internalização (YOSHIDA, 2006; NEIRA et al., 2002).

Em formas tripomastigotas, derivadas de culturas, algumas das moléculas importantes para o processo de invasão são as moléculas conhecidas como Tc85, trans-sialidase (TS) e cruzipaina (OUAISSI et al., 1986; ALVES et al 1986), as quais podem ligar-se a diferentes componentes da célula hospedeira, como: citoqueratina 18 (MAGDESIAN et al., 2001) e a componentes de matriz extracelular, como fibronectina (OUAISSI et al., 1986) e laminina (GIORDANO et al., 1994). A trans-sialidase é uma enzima de *T. cruzi* capaz de remover ácido siálico das glicoproteínas da célula hospedeira e o transfere para suas próprias moléculas, facilitando sua penetração na célula hospedeira e a evasão do lisossoma (FERREIRO-GARCIA et al., 1993; GIORGI et al., 2011).

Outra molécula de *T. cruzi* importante para o processo de invasão é a cruzipaina, uma importante cisteína proteinase que é capaz de ativar a liberação de cálcio dos estoques intracelulares (DE SOUZA et al., 2010).

Estudos com macrófagos realizados por Nogueira (1976) demonstraram que a glicoproteína gp90 regula negativamente a invasão do parasito na célula hospedeira com baixos níveis de indução do sinal de cálcio. Desta forma, percebemos que diferentes moléculas de *T. cruzi*, bem como diferentes formas do parasito, expressam diferentes moléculas de superfície.

Sendo assim, independente da molécula de superfície envolvida no processo de adesão/invasão, é importante que ocorra mobilização de cálcio para invasão e modificações da membrana no processo de internalização de *T. cruzi* na célula de mamífero.

Um estudo de microscopia eletrônica realizado por Nogueira e Conh (1976) revelou que o mecanismo de entrada das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* em células fagocíticas ocorre através da polimerização de actina, uma proteína constitutiva do citoesqueleto de eucariotos essencial para a formação de projeções de membrana associadas ao processo de fagocitose. Segundo Woolsey e Burleigh, 2004, a polimerização de actina da célula hospedeira é necessária para a retenção do parasito e associação de compartimentos da via endossomal/lisossomal.

Em macrófagos, ocorre a participação de macromoléculas glicosiladas ricas em galactose, manose, fucose, N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina (ARAUJO-JORGE, 1984; GARRIDO et al., 2011; VÁZQUEZ et al., 2014). Araújo-Jorge (1984) demonstrou que o pré-tratamento de epimastigotas com tripsina não interfere na fagocitose, no entanto, ela verificou um aumento significativo na fagocitose de formas tripomastigotas por macrófagos peritoneais após o pré-tratamento dos macrófagos com esta enzima. Os resultados obtidos, em conjunto com outros trabalhos, demonstram que glicoproteínas e/ou glicolípidios na membrana do macrófago reconhecem componentes e/ou opsoninas na superfície do parasito. Alguns dos receptores de macrófagos, tais como, para Fc e C3b (HUBER et al., 1968) e receptores

Toll-like 2 têm um papel importante no processo de fagocitose (MAGANTO-GARCIA et al., 2008).

O *T. cruzi* invade a célula hospedeira de forma muito peculiar, onde as membranas do parasito e da célula hospedeira sofrem modificações importantes que variam de acordo com o tipo celular e com o mecanismo de invasão do parasito (ANDREWS (1995); ANDRADE e ANDREWS (2005)). A ligação do parasito às integrinas da célula hospedeira induz uma elevação nos níveis de íons  $Ca^{+2}$  no citoplasma da célula, e em seguida ocorre recrutamento de lisossomos para o local de entrada do *T. cruzi* e, posteriormente, fusão da membrana lisossomal com a membrana da célula (TARDIEUX et al., 1992).

No citoplasma, o parasito sofre modificações morfológicas e bioquímicas e após duas horas do contato inicial a membrana do vacúolo parasitóforo é lisada pela ação de uma proteína denominada porina, sintetizada pelo parasito (ANDREWS et al., 1990). Com isso a forma amastigota do parasito prolifera no citoplasma da célula até o momento de ruptura e liberação de formas tripomastigotas que podem infectar novas células e tecidos e, desta forma, estabelecer a propagação da infecção.

### 1.3 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas apresenta basicamente três formas clínicas: a forma aguda, a forma indeterminada e a forma crônica cardíaca e/ou digestiva (PRATA, 2001).

A forma aguda da infecção dura poucas semanas e caracteriza-se pelo elevado número de parasitos na corrente sanguínea, os quais podem ser identificados por métodos de análise convencionais, tais como a pesquisa de *T. cruzi* no sangue direto ou por método de concentração (NETO et al., 1999). No entanto, nesta fase dificilmente a doença é detectada e passa despercebida, tanto pelo paciente, como pelo médico, devido a semelhanças de sintomas com outras patologias (DIAS, 1997; OMS, 2002).

Esta fase da infecção normalmente é assintomática, mas a literatura relata que menos de 10% das pessoas infectadas podem desenvolver o sinal de Romaña, que é caracterizado pelo edema bipalpebral e facial unilateral, causando diminuição da fenda palpebral, podendo ocorrer prurido, lacrimejamento e dor local leve, que pode ser acompanhada por um quadro febril que varia em torno de 38 °C (DIAS, 1990; RASSI et al., 2000). Além disso, os indivíduos infectados com o *T. cruzi* podem apresentar manifestações clínicas como: febre, mal-estar e dor de cabeça. Nesse período da infecção, ainda podem ocorrer complicações sistêmicas como: aumento do volume dos linfonodos (linfadenopatia), do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia), além de comprometimento cardíaco e até mesmo alterações neurológicas como a meningoencefalite (MARICONI, 1999). Nesta fase, pode ocorrer ainda miocardite difusa (RASSI, 2000). A equipe de Andrade (2000) demonstrou em modelos experimentais que também podem ocorrer sinais clínicos de miocardite aguda difusa.

Normalmente, após a fase aguda da infecção, 60% dos casos evoluem para a forma crônica indeterminada (LANNI e MADY, 1998). Essa fase é definida como a fase prolongada da infecção, sendo caracterizada clinicamente como silenciosa, onde os indivíduos podem viver cerca de 5-10 anos ou mais sem apresentar sintomas e sinais clínicos, como as alterações cardíacas e/ou digestivas evidenciadas pelos exames clássicos (RIBEIRO et al., 2000).

Estudos realizados por Andrade et al. (1997), em modelos caninos, mostraram que os cães permaneceram clinicamente e eletrocardio-graficamente normais até 3,5 anos, mantendo os resultados dos testes sorológicos positivos durante este período de tempo. No entanto, pequenos focos de miocardite crônica estavam presentes com edema intersticial, fibrose leve, e infiltração de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas. Estes resultados estavam em forte contraste com os observados no modelo canino durante a infecção aguda por *T. cruzi*.

Segundo Cunha-Neto et al. (2006), cerca de 20-30% dos indivíduos evoluem para a forma crônica cardíaca, que é caracterizada pela ausência de parasitos circulantes (PRATA, 2001) e pela miocardite inflamatória com

destruição da musculatura cardíaca e comprometimento das vias de condução do estímulo cardíaco (DIAS, 2006).

Na fase crônica da doença ainda podem ocorrer alterações, tais como o megacólon e megaesôfago em 5 a 10% dos pacientes infectados pelo *T. cruzi*, mas é importante enfatizar que a cardiomiopatia chagásica é a forma clínica mais séria e que traz as complicações da doença, levando ao aumento de volume do coração e alterações morfofisiológicas do mesmo. Microscopicamente, observa-se a presença de áreas com fibrose. Esta alteração confere rigidez miocárdica e é um fator determinante de insuficiência cardíaca. Além disso, observa-se também um grande infiltrado mononuclear difuso. Diante desse quadro, o indivíduo evolui para óbito (MARIN-NETO et al., 2007).

#### 1.4 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Desde a descoberta da doença de Chagas, vários grupos vêm testando diversas drogas contra o *T. cruzi* na tentativa de encontrar um medicamento eficaz para o tratamento da doença. No entanto, mais de cem anos após a descoberta da doença, ainda não existe um medicamento eficiente, particularmente na fase crônica da infecção.

Atualmente são utilizados dois fármacos na prática clínica: o nitrofurano nifurtimox (Lampit®/Bayer 2502), 1,1-dióxido da tetraidro-3-metil-4[(5-nitrofurfurilideno)amino]-2H-1,4-triazina) e o benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, um derivado de nitroimidazol) (Figura 3), atualmente produzido pelo Laboratorio Elea da Argentina. O primeiro não é mais usado no Brasil, devido aos seus importantes efeitos tóxicos e o benzonidazol vem sendo utilizado até hoje, mas diversos autores apontam consideráveis efeitos tóxicos (CASTRO, 2000; CASTRO et al., 2006).

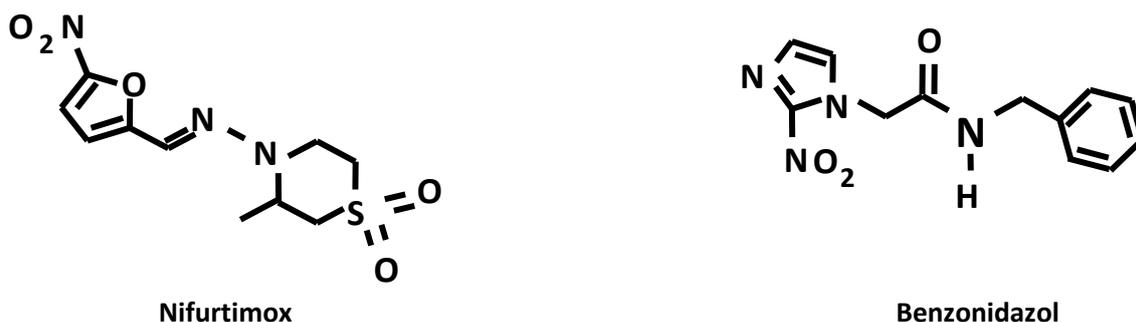


Figura 3. Estruturas moleculares dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas (CASTRO et al., 2006).

Apesar dos efeitos tóxicos induzidos pelo benzonidazol, o tratamento de pacientes, com a doença de Chagas, tem revelado eficácia acima de 60% de cura na fase aguda da doença (0-4 meses após a infecção) (SHIKANAI-YASUDA et al., 1990; ANDRADE et al., 1992; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000; CANÇADO, 2002; PINTO et al., 2013), na fase crônica recente (crianças de 0-14 anos de idade) (FERREIRA, 1990; SOSA-ESTANI et al., 1998; ANDRADE et al., 2004), e em infecções congênitas (RUSSOMANDO et al., 1998; SCHIJMAN et al., 2003; CHIPPAUX et al., 2010; CDC, 2012).

Na fase crônica tardia o benzonidazol apresenta baixa efetividade em termos de cura clínica, em alguns casos com 0% de cura, detectados através de PCR (LAURIA-PIRES et al., 2000; BRAGA et al., 2000; LANA et al., 2009). Nos casos em que o benzonidazol apresentou melhor eficácia, à percentagem de cura foi em torno de 19%, em pacientes de 20 a 59 anos de idade, os quais foram detectados através de técnicas de imunofluorescência e hemoaglutinação indireta (VIOTTI et al., 1994).

Estudos realizados por Cançado e Brener (1979) demonstraram a efetividade do benzonidazol em pacientes na fase crônica, mas o tratamento não foi totalmente eficaz, devido a positividade no teste de xenodiagnóstico em 8 de 20 pacientes (40%) após o tratamento. Esse resultado demonstra que o benzonidazol apresenta efeito supressivo, mas não é capaz de promover a cura dos pacientes.

Pinto et al. (2013) demonstraram que o benzonidazol foi capaz de promover a cura (sorologia negativa) de 27% pessoas com doença de Chagas

na fase aguda transmitida por fonte oral, nos estados do Pará e Amapá. Nesse estudo 2,7% pessoas apresentaram miocardite leve e 132 pessoas apresentaram sorologia positiva. Segundo Pinto et al. (2013) esses dados indicam a ineficácia do tratamento devido a positividade nos testes para detecção de *T. cruzi* na maioria das pessoas infectadas.

A Organização Mundial de Saúde recomenda o uso do benzonidazol para todos os pacientes da fase aguda, crianças com até 14 anos de idade, casos congênitos e, inclusive, para pacientes na fase crônica da doença. No entanto, na prática médica existe controvérsia em relação ao uso do benzonidazol e os médicos só usam medicamentos paliativos, em casos de pacientes com miocardite dilatada. Alguns estudos não recomendam o uso do benzonidazol nesta fase devido à falta de evidências concretas da eficácia do benzonidazol (BRENER, 1984) e aos possíveis mecanismos auto-ímmunes (Cunha-Neto et al., 2011). Outros estudos indicam o uso do benzonidazol nesta fase, pois os pacientes tem apresentado melhora clínica (GUTIERREZ et al., 2009a; VIOTTI, 2007; VIOTTI et al., 2014).

Apesar da OMS e da opinião de cientistas do grupo NHEPACHA (Nuevas Herramientas para el Diagnóstico y la Evaluación del Paciente con Enfermedad de Chagas/Novas ferramentas para o diagnóstico e avaliação de pacientes com a doença de Chagas), indicarem o tratamento com benzonidazol de todos os pacientes na fase crônica da doença, este medicamento ainda esta longe de atender, de forma adequada, às demandas para o tratamento desta doença, pois ele apresenta baixa eficiência principalmente na fase crônica e ainda estão associados a importantes efeitos colaterais, como excitações nervosas, depressão, anorexia, perda de peso, náuseas, vômitos, insônias e convulsões (STOPANNI, 1999; CASTRO, 2000; CASTRO et al., 2006).

Devido às limitações dos medicamentos citados acima para o tratamento, da doença de Chagas, diversos compostos já foram testados, como o alupurinol (ÁVILA et al., 1984), inibidores da biossíntese de ergosterol (URBINA, 2002), a via das poliaminas (SCHWARCZ et al., 1993; MENEZES et al., 2006), as moléculas que contém amidinas (DE SOUZA et al., 2004; DE SOUZA et al., 2011; SOEIRO et al., 2013a) e os compostos derivados de  $\beta$ -lapachona

(BOVERIS et al., 1978; DOCAMPO et al., 1979; MENNA-BARRETO et al., 2005; DA ROCHA et al., 2013).

O alopurinol foi testado *in vitro* e *in vivo* em camundongos e o resultado obtido foi muito satisfatório, com supressão da parasitemia (BRENER et al., 2000), porém quando administrado em pacientes na fase aguda da doença, não foi observada cura destes pacientes, apesar de apresentarem boa tolerância (ÁVILA et al., 1984; WERNER et al., 1998; STOPANNI, 1999).

Os inibidores da biossíntese de ergosterol, a exemplo do cetoconazol e itraconazol, foram testados no tratamento da doença de Chagas. O teste com estes derivados azólicos revelaram que o *T. cruzi* apresentou sensibilidade, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* em modelo murino (URBINA, 2002). Os derivados triazólicos como D0870 e TAK-187 promoveram cura parasitológica em infecção experimental de 70-100% em diferentes cepas testadas na fase aguda da infecção (MOLINA et al., 2000, 2001; URBINA et al., 2003a).

Na fase crônica foi observada cura parasitológica de 30-45% dos animais tratados com o D0870, no entanto, o ensaio clínico apresentou baixos níveis de cura dos pacientes (ARAÚJO et al., 2000; MOLINA et al., 2000, 2001). Estudos recentes demonstraram que um novo derivado triazólico inibidor de C14 $\alpha$ -lanosterol-demetilase (CYP51) é capaz de inibir a biossíntese de ergosterol do parasito e promover cura de animais infectados nas fases aguda e crônica da doença de Chagas além de serem ativos contra cepas resistentes ao nifurtimox e ao benzonidazol (BUCKNER, 2008; SOEIRO et al., 2013a).

Dentre as classes de compostos triazólicos, o posaconazole (Schering-Plough Research Institute) e o ravuconazol (Eisai Company) são potentes inibidores da síntese de ergosterol e já estão sob ensaio clínico em pacientes Chagásicos, demonstrado atividade também em modelos murinos (URBINA et al., 2003b; URBINA, 2009; DE CASTRO et al., 2011). Porém ensaios clínicos recentes mostraram falhas terapêuticas em portadores crônicos após tratamento com o posaconazole (MOLINA et al., 2014).

O posaconazole quando é utilizado em combinação com outras drogas, como por exemplo: a amiodarona (droga anti-arrítmica utilizada para o tratamento de pacientes sintomáticos na fase crônica da doença) e o benzonidazol apresentam uma potente atividade sinérgica contra o parasito em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (VEIGA-SANTOS et al., 2012; DINIZ et al., 2013). No entanto, os derivados azólicos citados acima apresentam limitações importantes, devido aos seus altos custos e ao potencial de induzir resistência, além disso, são necessárias altas doses para atividade tripanocida necessária (LEPESHEVA e WATERMAN, 2011).

As vias das poliaminas são outros importantes alvos para quimioterapia em *T. cruzi*, pois estão envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação das células. Hernández et al. (2006) demonstraram que a espermina, uma poliamina caracterizada por quatro grupamentos amino em sua molécula, exerce um efeito protetor contra lipoperoxidação em *T. cruzi*. Além disso, foi demonstrado que um análogo de putrescina (diamina) 1,4-diamino-2-butanona (DAB) é capaz de inibir a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* (MENEZES et al., 2006) e promastigotas de *Leishmania amazonensis* (VANNIER-SANTOS et al., 2008), revelando por microscopia eletrônica a desorganização da arquitetura celular e danos à mitocôndria em ambos os protozoários.

A classe de compostos com amidinas tem demonstrando, potencial atividade contra *Leishmania amazonensis* e *T. cruzi* (DE SOUZA et al., 2004; 2011; BATISTA et al., 2010; SOEIRO et al., 2013b). Em modelos murinos a amidinofenil (3-bromo-4-metil-2, 5-bis (4-amidinofenil) (DB1362) reduziu parcialmente o número de parasitos de animais infectados com *T. cruzi* da cepa Y (DA SILVA et al., 2008). Ainda não está claro qual o mecanismo de ação das moléculas com amidina, no entanto Daliry et al. (2011) demonstraram que a atividade tripanocida de amidinas não está diretamente relacionada com a força de associação e localização ao DNA do cinetoplasto.

Além dos compostos supracitados acima, outra classe de compostos que apresenta atividade potencial contra *T. cruzi* nas três formas evolutivas e também na infecção experimental *in vitro* e *in vivo* são os compostos derivados

de  $\beta$ -lapachona. Em modelos celulares a atividade da  $\beta$ -lapachona sobre *T. cruzi* foi demonstrada inicialmente, por Boveris et al. (1978) e Docampo et al. (1978).

### 1.5 A $\beta$ -LAPACHONA

A  $\beta$ -lapachona é uma substância natural obtida a partir do lapachol (LIMA et al., 1956). O lapachol é uma naftoquinona natural conhecida desde 1858 e é encontrada como constituinte de várias plantas das famílias Verbenaceae, Bignoniaceae e Proteaceae. No entanto, a maior ocorrência dessa substância foi encontrada em plantas da família Bignoniaceae, e gênero *Tabebuia* (PINTO et al., 1977).

O lapachol foi isolado do ipê roxo por Lima et al. (1956). A denominação deriva do fitomedicamento conhecido como "red lapacho" obtido por infusão de folhas de Pau d'arco (*Tabebuia impetiginosa*), que pode ser considerada uma commodity etnofarmacológica global (GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009). Desde então muitas pesquisas sobre a química das naftoquinonas (lapachol,  $\alpha$  e  $\beta$ -lapachona) isoladas de espécies do gênero *Tabebuia* sp, vem sendo realizadas, para compreender a atividade dessas substâncias (LIMA et al., 1956; PINTO et al., 1977; DOCAMPO et al., 1977; CRUZ et al., 1978; LOPES et al., 1978; BOVERIS et al., 1978).

A grande variedade estrutural de quinonas de origem natural como exemplo a  $\beta$ -lapachona, tem despertado interesse devido à sua atividade potencial na terapia do câncer (LI et al., 2003). A atividade anticâncer de  $\beta$ -lapachona esta relacionada com ação sobre atividade enzimática de NAD(P)H: NQO1 (quinona oxidoreductase 1). A NQO1 é altamente expressa em muitos tumores humanos, tais como: tumores de colon, mama, fígado e pulmão (SCHOR e MORRIS, 1977; CRESTEIL e JAISWAL, 1991; SIEGEL e ROSS, 2000; STRASSBURG et al., 2002; SIEGEL et al., 2012).

As naftoquinonas são quinonas relacionadas ao sistema naftalênico. Quando duas carbonilas estão nas posições 1, 2 do anel naftaleno são

chamadas de *o*-naftoquinonas e quando nas posições 1, 4 de *p*-naftoquinonas (Figura 4A e B).

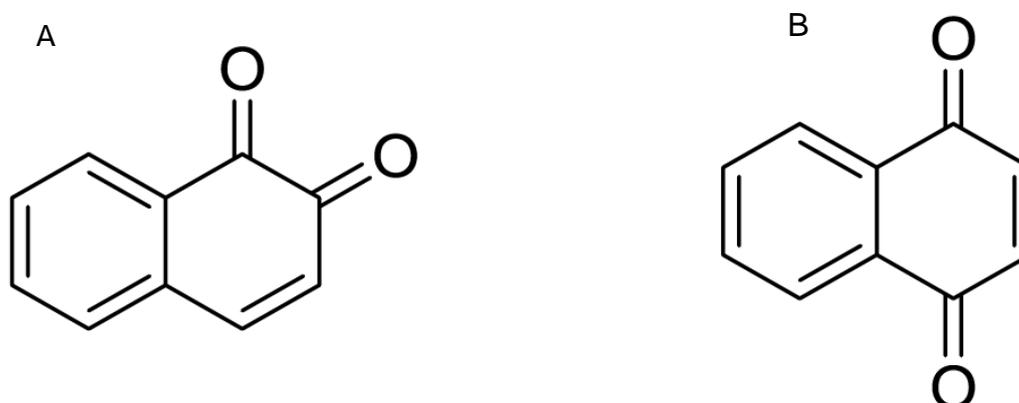


Figura 4. Estrutura molecular das naftoquinonas. Em (A) lapachol e em (B)  $\beta$ -lapachona (FERREIRA et al., 2010).

De acordo com esse sistema de classificação naftalenica, a  $\beta$ -lapachona é considerada como uma *o*-naftoquinonas. A atividade antimicrobica das naftoquinonas foi investigada por Lima et al. (1956) em cepas de bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *B. anthracis*, *B. cereus* e *Escherichia coli*.

Pinto et al. (1977) demonstraram que as naftoquinonas e alguns de seus derivados bloqueavam a penetração de cercárias do *Schistosoma mansoni* na pele de camundongos. Além disso, as naftoquinonas apresentam outras atividades biológicas, tais como: anti-tumoral (LI et al., 1999), antivirais (SACAU et al., 2003), moluscicida (SILVA et al., 2005), leishmanicida (FERRARI, 2005) e tripanocida (BOVERIS et al., 1978, DO CAMPO et al., 1979; PINTO et al., 2000; SANTOS et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2001; DE MOURA et al., 2001; 2004, MENNA-BARRETO et al., 2005, 2007).

O mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona ainda não está totalmente esclarecido, mas existem evidências de que a estrutura molecular da  $\beta$ -lapachona apresenta uma propriedade redox, conferida pelo grupamento quinona o qual é reduzido por ação da enzima NADPH redutase, gerando ânion radical semiquinona ( $Q^{\cdot-}$ ), que pode interagir com o oxigênio molecular (SILVA et

al., 2003) e produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical aniônico superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DOCAMPO et al., 1979; PINK et al., 2000; ROSS et al., 2000).

Essas EROs são tóxicas para *T. cruzi* e podem interagir com macromoléculas importantes do parasito, como RNA, DNA e proteínas, podendo induzir diferentes mecanismos de morte celular, como autofagia (MENNA-BARRETO et al., 2009a; DUSZENKO et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; SALOMÃO et al., 2013), apoptose (SILVA et al., 2003; MENNA-BARRETO et al., 2009a) no *T. cruzi* e necrose programada em células tumorais (PARK, 2014; CHO, 2014). Segundo Li et al. (2003), o mecanismo apoptótico promovido pela ação da  $\beta$ -lapachona ocorre através da inibição de enzimas específicas, como as topoisomerasas, durante o processo de replicação de DNA.

A apoptose, também conhecida como morte celular programada caracteriza-se pela fragmentação de DNA, exposição do fosfolípido fosfatidilserina na superfície celular, entre as protrusões ou "blebs" de superfície, os quais culminam por gerar os corpos apoptóticos, que são fragmentos celulares delimitados por membranas. Este tipo de morte ocorre em condições fisiológicas ou em respostas a diversos estímulos, como drogas e defesa contra patógenos (SAMUILOV et al., 2000).

A autofagia envolve um sistema autofagossomal-lisossomal para o englobamento de organelas e constituintes citoplasmáticos, em condições fisiológicas ou em resposta a estresse nutricional ou oxidativo (REZ et al., 1991; BURSCH, 2001). Enquanto que a necrose é descrita como tipo morte acidental de células e tecidos, este tipo de morte envolve alterações mitocondriais, perda da homeostase e geração de EROs (RODRIGUES et al., 2006; ZONG e THOMPSON et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que a necrose programada pode ocorrer como mecanismo de morte celular em câncer, após tratamento com  $\beta$ -Lapachona, com o envolvimento de EROs e NQO-1 (quinona oxidoreductase-1) (PARK, 2014; CHO, 2014).

De acordo com os trabalhos de Menna-Barreto et al. (2005; 2007; 2009a; 2009b) estes mecanismos de morte descritos acima já foram evidenciados em *T.*

*cruzi* após o tratamento com a  $\beta$ -lapachona. Desse modo, é de extrema relevância a continuidade de estudos com a  $\beta$ -lapachona nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, bem como na infecção *in vitro*. Nesse sentido, o nosso grupo vem trabalhando com um composto inédito codificado como R72 na tentativa de encontrar um fármaco potencial que apresente maior eficácia e menor toxicidade para o tratamento da doença de Chagas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora a doença de Chagas ocasione perdas econômicas anuais de ao menos U\$ 1.3 bilhões (OMS, 2013), não houve interesse econômico por parte da Roche em manter a patente do Rochagan, portanto essa foi transferida ao Laboratório ELEA da Argentina. Isso demonstra que centros de pesquisa e universidade precisam avaliar alternativas sustentáveis para a terapêutica da doença de Chagas.

Devido à importância da doença de Chagas na América Latina e a dificuldade de se obter fármacos específicos que atinjam especificamente o metabolismo do protozoário e a necessidade de entendermos melhor sobre a biologia celular de *T. cruzi* e os processos de interação parasito/macrófago, o desenvolvimento desse trabalho justifica-se pela busca de novas substâncias, que apresente melhor eficácia e menor toxicidade no tratamento de pessoas infectadas com *T. cruzi*.

Estudos realizados durante o mestrado no Laboratório de Biomorfologia Parasitária do CPqGM (ANJOS, 2009) indicaram que o composto derivado de  $\beta$ -lapachona R72 apresenta atividade tóxica para forma epimastigota de *T. cruzi*, causando intensas alterações no protozoário, em compartimentos como: danos mitocondriais, no complexo de Golgi, nos reservossomos, bem como, formação de vacúolos autofágicos, indicando processos distintos de autofagia o qual foi confirmado pela sonda monodasil-cadaverina (MDC). Assim, o presente trabalho visou estender estes dados, afim de, levar ao desenvolvimento de terapia alternativa para doença de Chagas, bem como compreensão do(s) mecanismo(s) de ação deste composto inédito sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* e na infecção experimental *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o(s) efeito(s) de derivados de  $\beta$ -lapachona sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e na infecção de macrófagos *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade dos compostos derivados de  $\beta$ -lapachona sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* e na interação parasito-macrófago;
- Avaliar o efeito citotóxico do composto derivado de  $\beta$ -lapachona sobre culturas de macrófagos e esplenócitos;
- Determinar a concentração inibitória de 50% sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Elucidar o(s) mecanismo(s) de ação do composto R72 sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* e na interação parasito macrófago *in vitro* através da análise ultraestrutural;
- Analisar o efeito do composto sobre *T. cruzi* quanto ao potencial em deflagrar em diferentes mecanismos de morte celular.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 COMPOSTOS TESTADOS

Os compostos foram obtidos pelo grupo de pesquisas do Dr. João Batista da Costa do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os compostos derivados de  $\beta$ -lapachona foram designados como R72, R85 e R86.

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem suíço, fêmeas ou machos, com 6 a 10 semanas de idade, criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ) e no biotério da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do CPqGM – FIOCRUZ sob licença nº L-023/09.

### 4.3 OBTENÇÃO E CULTIVO DE MACRÓFAGOS

#### 4.3.1 Macrófagos peritoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais camundongos de linhagem suíça, foram inoculados por via intraperitoneal com 10 mL de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada (4 °C) e estéril e em seguida, foi feita massagem no peritônio do animal para soltar os macrófagos residentes. Após 5 minutos de massagem peritoneal, o líquido contendo as células foi coletado da cavidade peritoneal com seringas e centrifugado a 350 g a 4 °C por 10 minutos. Logo após a centrifugação, as células foram quantificadas em câmara de

Neubauer e o plaqueamento das células foi realizado sobre lamínulas na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL em placas culturas de 24 poços. As culturas foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> (MEIRELLES et al., 1982).

#### 4.3.2 Macrófagos J774

Os macrófagos J774 foram cultivados em meio RPMI 1640 (GIBCO®) suplementado com 10% de SBF em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, por 72 horas. Os repiques foram realizados utilizando tripsina ou PBS gelado sob agitação na garrafa para o desprendimento das células. Em seguida, as células foram coletadas, quantificadas e utilizadas para novos repiques e para os ensaios biológicos.

#### 4.3.3 Obtenção de esplenócitos

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade do composto R72 em culturas de esplenócitos, o baço dos animais foram retirados e macerados com o êmbolo de uma seringa estéril em 8mL de meio RPMI 1640 (ambiente estéril). Em seguida, a solução foi transferida para tubos plásticos cônicos de 15 mL, a qual ficou em repouso por 3 minutos para decantação dos fragmentos de tecido. Após este tempo o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 200 g, por 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente, o sedimento obtido foi ressuspensão e as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 incompleto. Após a última lavagem o sedimento foi ressuspensão em 1mL de meio RPMI completo para contagem das células em câmara de Neubauer. As culturas foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF por 24, horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Todos os experimentos foram realizados com a cepa Y de *T. cruzi* (derivados de cultura J774). As formas tripomastigotas foram cultivadas *in vitro* e *in vivo*. Para obtenção de formas tripomastigotas, as culturas de macrófagos J774 foram infectadas com tripomastigotas sanguícolas cepa Y numa proporção de 10 parasitos por macrófagos (10:1). Após 7 dias de cultivo (pico de parasitemia), os sobrenadantes das culturas contendo as formas tripomastigotas foram coletados, centrifugados a 200 g por 10 minutos e após 30 minutos os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 1000 g por 10 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 1mL de meio RPMI e as quantificações de parasitos viáveis foram realizadas para os ensaios biológicos utilizando câmara de Neubauer.

Para obtenção de formas tripomastigotas sanguícolas, os animais foram infectados e o sangue coletado no pico da parasitemia (7 dias). O sangue foi coletado por punção cardíaca com seringas heparinizadas. Após as coletas de sangue, foram adicionados os mesmos volumes de PBS (1:1 sangue/PBS) e em seguida, os tubos foram centrifugados a 200 g por 10 minutos, e após a centrifugação os tubos contendo o sangue foram mantidos na estufa por 30 minutos, após este tempo os sobrenadantes contendo os parasitos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 1mL de meio completo, quantificados em câmara de Neubauer e utilizados para a infecção das culturas de macrófagos J774 (ARAÚJO-JORGE e DE SOUZA, 1984).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE $\beta$ -LAPACHONA SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Os parasitos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os parasitos foram ressuspensos em 1mL de meio RPMI para quantificação. Os experimentos foram realizados utilizando inóculos de  $10^7$  parasitos/mL. Os parasitos foram incubados por 24 horas na presença e ausência dos compostos derivados de  $\beta$ -lapachona (R72, R85 e

R86). Os efeitos dos compostos foram avaliados por contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

#### 4.6 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas com o composto R72 nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{M}$ , em triplicata, por 24 horas. Após este tempo de incubação com o R72, alíquotas do sobrenadante foram coletadas para quantificação de parasitos viáveis. Com os resultados obtidos, foram calculadas as percentagens de inibição (PI) para cada concentração testada, através da seguinte fórmula:

$$\text{PI} = 100 - \text{valor tratado/valor do controle DMSO} \times 100$$

Os valores foram utilizados para determinação da concentração inibitória de 50% no software GRAPHPAD PRISM versão 5.0.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Para avaliar a citotoxicidade do composto derivado de  $\beta$ -lapachona em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y),  $1 \times 10^7$  parasitos foram incubados com a R72 em cinco concentrações diferentes (12, 37, 111, 333, 1000  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Após este período, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  (5mg/mL) de MTT 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo tetrazol (Sigma-Aldrich) em todos os poços por 3 horas nas mesmas condições de cultivo conforme descrito por Mosmann (1983).

O método permite medir a atividade da desidrogenase mitocondrial, o potencial redox indicativo de atividade metabólica e, portanto, viabilidade, a qual gera cristais de formazam mensurados colorimetricamente. Após a reação, os parasitos foram centrifugados, a 1000 g, por 10 minutos e em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em DMSO (Sigma-Aldrich) para completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo

mitocondrial, resultando assim, em uma coloração. Em seguida, a absorvância foi determinada em 570 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices), Sunnyvale, California (EUA). O percentual de parasitos viáveis (VB) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade (VB)} = (\text{Absorvância do tratado} / \text{Absorvância do controle}) \times 100$$

#### 4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

##### 4.8.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os parasitos foram tratados com o composto R72 a 15  $\mu\text{M}$  e após 24 horas de incubação, coletados e centrifugados a 1000 g por 10 minutos e lavados duas vezes com PBS estéril. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os parasitos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Após a fixação, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão duas vezes e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5mM, ao abrigo da luz, com o mesmo tampão. A seguir, os parasitos foram novamente lavados e desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), com duração de 10 minutos cada.

Resina epóxi Polybed (Polysciences) foi utilizada para a infiltração das células na proporção de 1:1 (acetona/resina) por 12 horas e resina pura por 14 horas e polimerização por 72 horas a 60°C. Após a polimerização, os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo, coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila a 7% e citrato de chumbo a 2% por 5 minutos. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1230 (VANNIER-SANTOS e LINS 2001).

#### 4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

O experimento foi realizado da mesma forma que o item 4.8.1. Após 24 horas de incubação com o composto R72 a 15  $\mu$ M, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5%. Após a fixação, as células foram lavadas com o mesmo tampão, ressuspensas e aderidas sobre lamínulas pré-cobertas com solução de poli-L-lisina por 30 minutos. As amostras foram pós-fixadas como descrito no item supracitado. Após este tempo, as células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), com duração de 10 minutos em cada etapa. Após as desidratações, as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico. As lamínulas foram montadas nos suportes para metalização. As amostras foram observadas no microscópio de varredura JEOL JSM 6390.

### 4.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO EM DIFERENTES TIPOS DE MORTE CELULAR

#### 4.9.1 Autofagia

Para investigar o processo de autofagia após 24 horas de tratamento com o composto R72 na concentração de 15  $\mu$ M, os parasitos foram incubados com 0,05 mM da sonda monodancilcadeverina (MDC) por 1 hora. Após este tempo, os parasitos foram lavados com PBS e fixados em 4% de paraformaldeído por 30 minutos. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 20  $\mu$ L e colocado sobre lâminas pré-cobertas com poli-L-lisina por 30 minutos, para adesão dos parasitos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não aderidos. Após as lavagens, as lâminas foram montadas e analisadas para quantificar a percentagem de parasitos positivos (MDC<sup>+</sup>), conforme descrito por Menna-Barreto et al. (2009a). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51.

#### 4.9.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por microscopia de fluorescência

Com o objetivo de verificar se o composto induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os parasitos foram tratados com o composto R72 a 15  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Após este tempo, os parasitos foram incubados com 10  $\mu\text{M}$  de dihidroetídeo (DHE) (Sigma-AldrichChemical Co) por 30 minutos. Em seguida, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS e após a última lavagem, os parasitos foram fixados em 4% de paraformaldeído por 30 minutos. Posteriormente, os parasitos foram aderidos em lâminas pré-cobertas com poli-L-lisina por 30 minutos. Após este período, os parasitos foram lavados com PBS para remoção dos parasitos não aderidos e analisados em microscópio de fluorescência Olympus BX51.

#### 4.9.3 Citometria de fluxo

##### 4.9.3.1 Avaliação de apoptose e/ou necrose

Foram utilizadas sondas fluorescentes específicas para marcação de alterações de membrana plasmática, visando à elucidação dos mecanismos de mortes de *T. cruzi* após o tratamento com o composto R72. Para detecção de apoptose e/ou necrose os parasitos foram incubados com o composto R72 na concentração de 15  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Após este período, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS estéril e centrifugados por 10 minutos a 1000 *g*. Após a última lavagem, os parasitos foram incubados com 10  $\mu\text{g/mL}$  de anexina V e com 10  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídio por 10 minutos e posteriormente analisadas por citometria de fluxo no aparelho Becton Dickison. Os experimentos foram realizados conforme descrito previamente (MENNA-BARRETO et al., 2005; 2007; 2009b).

#### 4.9.3.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.

Para quantificação da produção de EROs por citometria de fluxo o experimento foi realizado da forma como descrito no item 4.9.2. No entanto após a última lavagem, a quantificação de parasitos marcados com DHE foi realizada no citometro (aparelho Becton Dickison). Os experimentos foram realizados conforme descrito por Salomão et al. (2013).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO R72 EM CULTURAS DE ESPLÊNOCITOS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para avaliar a citotoxicidade do composto derivado de  $\beta$ -lapachona sobre culturas de esplenócitos e macrófagos,  $1 \times 10^6$  células foram semeadas e incubadas com a R72 em cinco concentrações diferentes (12, 37, 111, 333, 1000  $\mu$ M) por 24 horas. Após este período, foram adicionados em todos os poços 20  $\mu$ L (5mg/mL) de MTT 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo tetrazol (MTT) por 3 horas nas mesmas condições de cultivo. O método permite medir a atividade da desidrogenase mitocondrial, de células viáveis, a qual gera cristais de formazam mensurados colorimetricamente.

Após a reação, foi adicionado DMSO aos poços, de forma a obter uma proporção de 1:1 e homogeneizando bem até completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial, resultando assim, em uma coloração. Em seguida, a absorbância foi determinada em 570 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices), Sunnyvale, California (EUA).

Com os resultados obtidos foram calculados a percentagem de inibição através da fórmula citada no item 4.6. Os valores obtidos com esses cálculos foram plotados no programa GRAPHPAD PRISM versão 5.0 para a determinação da  $IC_{50}$ . Com os valores de  $IC_{50}$  obtidos na cultura de células de mamíferos e na forma tripomastigota foi possível calcular o índice de seletividade. Desse modo, o índice de seletividade (IS) foi calculado utilizando a

razão de  $IC_{50}$  obtido em células de mamíferos e a  $IC_{50}$  obtida na forma tripomastigota de *T. cruzi*, pela fórmula:

$$IS = \text{valor de } IC_{50} \text{ em células de mamíferos} / \text{valor } IC_{50} \text{ em tripomastigota}$$

#### 4.11 AVALIAÇÃO DO COMPOSTO NA INTERAÇÃO PARASITO-MACRÓFAGO

Os macrófagos foram coletados e semeados como descrito no item 4.3.1. Após 24 horas de cultivo (uma proporção de 10:1 parasitos/macrófagos) foram adicionados para interação com os macrófagos. Após 2 horas de interação, as culturas foram lavadas para remoção de parasitos livres. Em seguida, os macrófagos foram incubados na presença e na ausência do composto R72 a 50  $\mu$ M por 48 horas.

Após o tempo de incubação as células foram lavadas, fixadas com formaldeído 3,8 % e coradas com hematoxilina e eosina. A quantificação de macrófagos infectados foi realizada por contagem direta de 100 células/lamínula em microscópio óptico de campo claro.

##### 4.11.1 Avaliação da atividade do composto R72 sobre a capacidade fagocítica de macrófagos

Para avaliar se o composto interfere na capacidade fagocítica dos macrófagos, estes foram tratados previamente com o composto R72 a 50  $\mu$ M ou com DMSO e após 30 minutos de tratamento o meio contendo o composto foi removido e os parasitos foram adicionados. Após 30 minutos de interação, as culturas foram lavadas para remoção dos parasitos livres e um novo meio foi adicionado e incubado por 2 horas. Após essa incubação, as culturas foram lavadas duas vezes e fixadas para em formaldeído 3,8% por 30 minutos. Após este tempo as culturas foram lavadas com PBS, desidratadas em acetona (70-100% e xilol) por um minuto cada etapa e coradas com hematoxilina e eosina. Após a coloração as células foram quantificadas para calcular os índices de adesão e internalização dos parasitos aos macrófagos após o tratamento. O

índice de adesão (IA) foi calculado pela multiplicação da percentagem de células com parasitos aderidos pelo número médio de parasitos por célula, conforme descrito por Bianco et al. (1975), pela fórmula abaixo:

- $(IA = \% \text{ macrófagos com parasitos aderidos} \times n^{\circ} \text{ médio de parasitos associados por célula})$ .

Para o índice de internalização (Ii) foi avaliada a percentagem de células infectadas pelo número médio de parasitos internalizados por célula.

- $(Ii = \% \text{ de células infectadas} \times n^{\circ} \text{ médio de parasitos internalizados por célula})$ .

#### 4.11.2 Microscopia Eletrônica da Interação Parasito-Macrófago

##### 4.11.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para analisar o efeito ultraestrutural do composto R72 nos processos de adesão e internalização, os macrófagos foram semeados sobre lamínulas, em placas de 24 poços e tratados previamente com o composto R72 a 50  $\mu$ M ou com DMSO por 30 minutos, após este período, o meio contendo o composto foi removido e os parasitos adicionados. Após 30 minutos de interação, as culturas foram lavadas para remoção dos parasitos livres e um novo meio foi adicionado e incubado por mais 30 minutos. Após este tempo, as culturas foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas com o tampão supracitado e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%. por 40 minutos. Posteriormente as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em séries crescentes de acetona (30-100%), com duração de 10 minutos cada etapa. Após as desidratações as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico. As lamínulas foram então montadas nos suportes para metalização. As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390.

#### 4.11.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para analisar o efeito do composto R72 na ultraestrutura de macrófagos infectados por *T. cruzi*,  $2 \times 10^6$  células foram semeadas em placas de 6 poços e ficaram “overnight” na estufa saturada sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, as células foram lavadas e os parasitos adicionados para infecção (10/1 parasitos/macrófagos). Após duas horas de interação a cultura foi lavada para remoção dos parasitos não internalizados e cultivados por 24 e 72 horas na presença ou ausência do composto R72 a 50 µM. Após este período, as culturas foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M, coletadas com um raspador “scraper” e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%. Após a segunda fixação as células foram lavadas com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de acetona (30-100%). Na etapa de polimerização as células foram embebidas em resina e mantidas a 60°C para polimerização por 72 horas. Em seguida, os cortes ultrafinos foram coletados e contrastados como descrito acima (vide item 4.8.1). As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1230.

#### 4.11.3 Quantificação da produção de óxido nítrico por macrófagos

Para analisar a produção de óxido nítrico (NO) nos experimentos de interação parasito/macrófago e em macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  e LPS, as culturas foram incubadas na presença ou ausência do composto R72 a 50 µM por 24 horas. Após este período de incubação com o composto, foram coletados 100 µL dos sobrenadantes das culturas e incubados com igual volume com reagentes de Griess, sendo a mistura preparada na hora do uso (1% sulfanilamida, 0,1% de dihidroclorato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1% de diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED) (HIBBS et al., 1988), em temperatura ambiente por 10 minutos.

As amostras foram comparadas com os valores, da curva padrão, obtidos pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI 1640, em concentrações que variavam de 2 a 200  $\mu\text{M}$ . Como controles positivos, foram utilizadas concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* Sorotipo 0111:B4 – Sigma, St. Louis, MO, USA) e (40 U/mL Recombinant Mouse IFN- $\gamma$ /BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). A absorbância foi lida 540 nm em leitor de Elisa (Molecular Devices), Sunnyvale, California (EUA).

#### 4.11.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com pelo menos três repetições independentes. Os dados obtidos estão representados como a média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey, com níveis de significância de  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TRIAGEM DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE $\beta$ -LAPACHONA NAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Foi realizada a triagem dos compostos R72, R85 e R86 (derivados de  $\beta$ -lapachona) em formas tripomastigotas de *T. cruzi in vitro* na concentração de 50  $\mu$ M. Após 24 horas de tratamento com o composto derivado de  $\beta$ -lapachona observamos que o composto R72 reduziu, significativamente, ( $p < 0,05$ ) o número de parasitos viáveis. Já os compostos R85 e R86 não apresentaram efeitos sobre os parasitos (Figura 5).

Como o composto R72 apresentou redução significativa no número de parasitos viáveis, este foi utilizado para determinação da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>), avaliação na infecção *in vitro*, análise ultraestrutural e ensaios bioquímicos.

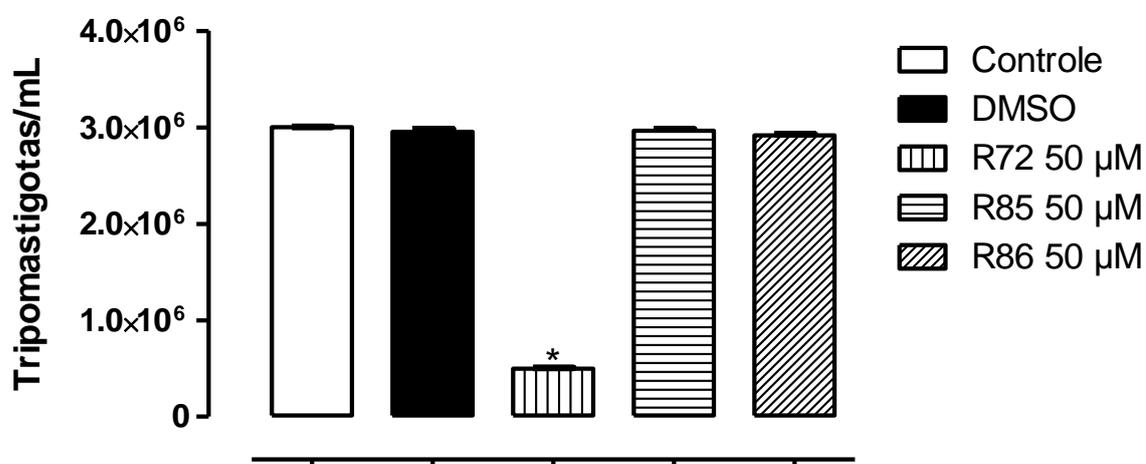


Figura 5. Efeito tripanocida de compostos derivados de  $\beta$ -lapachona em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, a 50  $\mu$ M, após 24 horas de incubação. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicadas para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle DMSO, (\*) representa a diferença estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA IC<sub>50</sub> EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Após a triagem dos compostos derivados de  $\beta$ -lapachona sob formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foi realizada curva concentração-resposta do composto que apresentou efeito tripanocida, com o objetivo de determinar a IC<sub>50</sub>. O experimento foi realizado utilizando as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu$ M por 24 horas de incubação.

Nas concentrações utilizadas o composto R72 revelou um efeito concentração dependente com 50% a 80% de inibição, apresentando valor de IC<sub>50</sub> de 15  $\mu$ M (Figura 6).

De acordo com o resultado obtido é possível verificar que o composto reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ), o número de parasitos (Figura 6), mesmo em concentrações inferiores à da droga de escolha (benzonidazol) empregada como controle positivo.

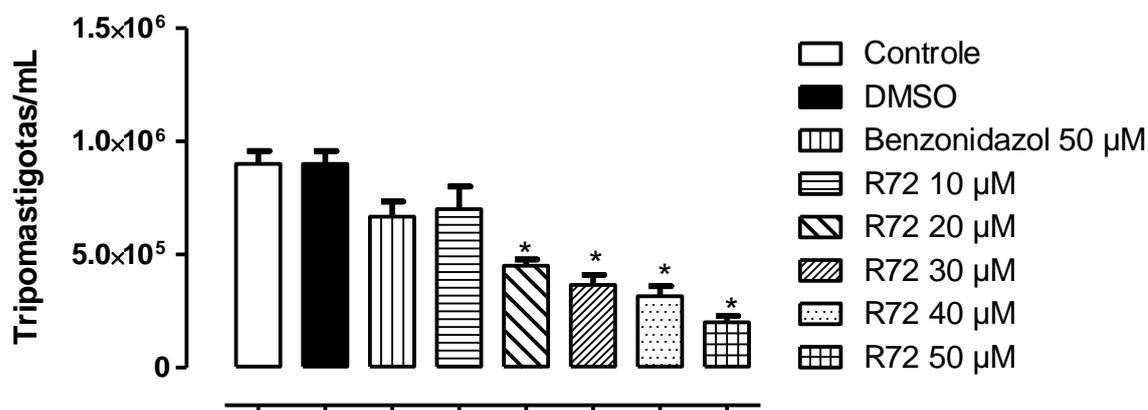


Figura 6. Efeito inibitório da R72 em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, em diferentes concentrações, após 24 horas de incubação. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicadas para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle DMSO, (\*) representa diferença estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

### 5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Para investigar e validar os efeitos citotóxicos do composto derivado de  $\beta$ -lapachona R72 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi utilizado o ensaio com o MTT (3-(4, 5-dimetiltriazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio brometo tetrazol). Ensaio com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (derivado de cultura) expostas às concentrações de 12, 37, 111, 333 e 1000  $\mu\text{M}$  do composto R72 resultou em perda de viabilidade do protozoário de forma concentração-dependente, evidenciando um potencial efeito desse composto no protozoário. Observamos cerca de 70% de redução de viabilidade dos parasitos na concentração de 12  $\mu\text{M}$  e 96% na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  (Figura 7), confirmando potencial efeito tóxico sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

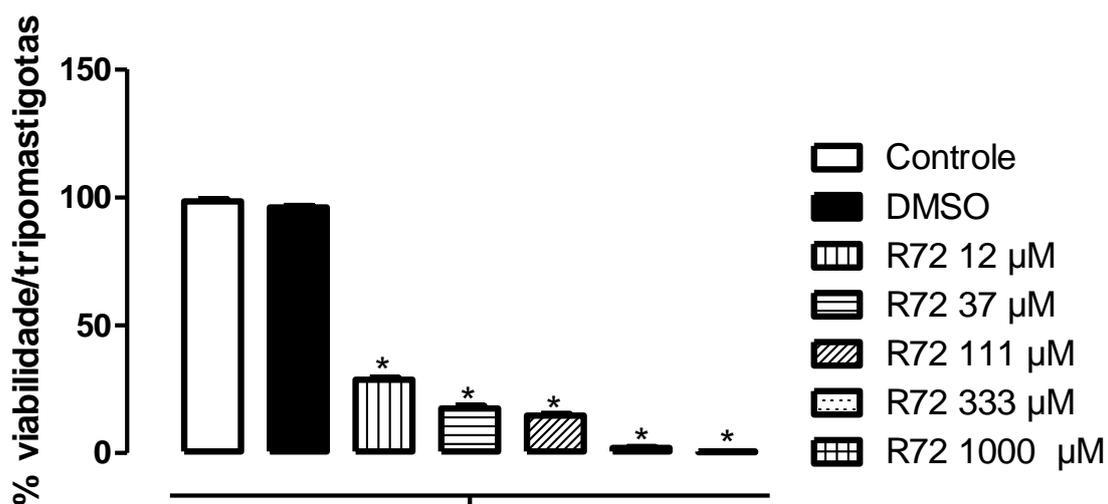


Figura 7. Avaliação da citotoxicidade em formas tripomastigotas *T. cruzi*, pelo método do MTT: Valores em porcentagem do número de parasitos viáveis após 24 horas de incubação com a R72, nas concentrações de 12 a 1000  $\mu\text{M}$ . Análise de variância (ANOVA) e pos-teste de Tukey foram aplicadas para determinar a diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle DMSO, (\*) representa diferença estatística determinadas por  $p < 0,05$ .

#### 5.4 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA R72 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após avaliar o efeito tóxico do composto em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o nosso próximo passo foi investigar o efeito do composto através de alterações ultraestruturais. Na avaliação por microscopia eletrônica de varredura foram observadas alterações ultraestruturais em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, após 24 horas de incubação com o composto R72. Podemos observar nos controles morfologia normal, com corpo alongado e fino, característico de formas tripomastigotas (Figura 8A-B). Após o tratamento observou-se que o composto induziu alterações morfológicas na região posterior do parasito, local onde fica localizado o cinetoplasto desta forma evolutiva (Figura 8C). Além disso, podemos observar na Figura 8D desorganização no corpo indicando áreas com destruição na membrana plasmática do protozoário revelando uma área indicativa de protusões de membrana.

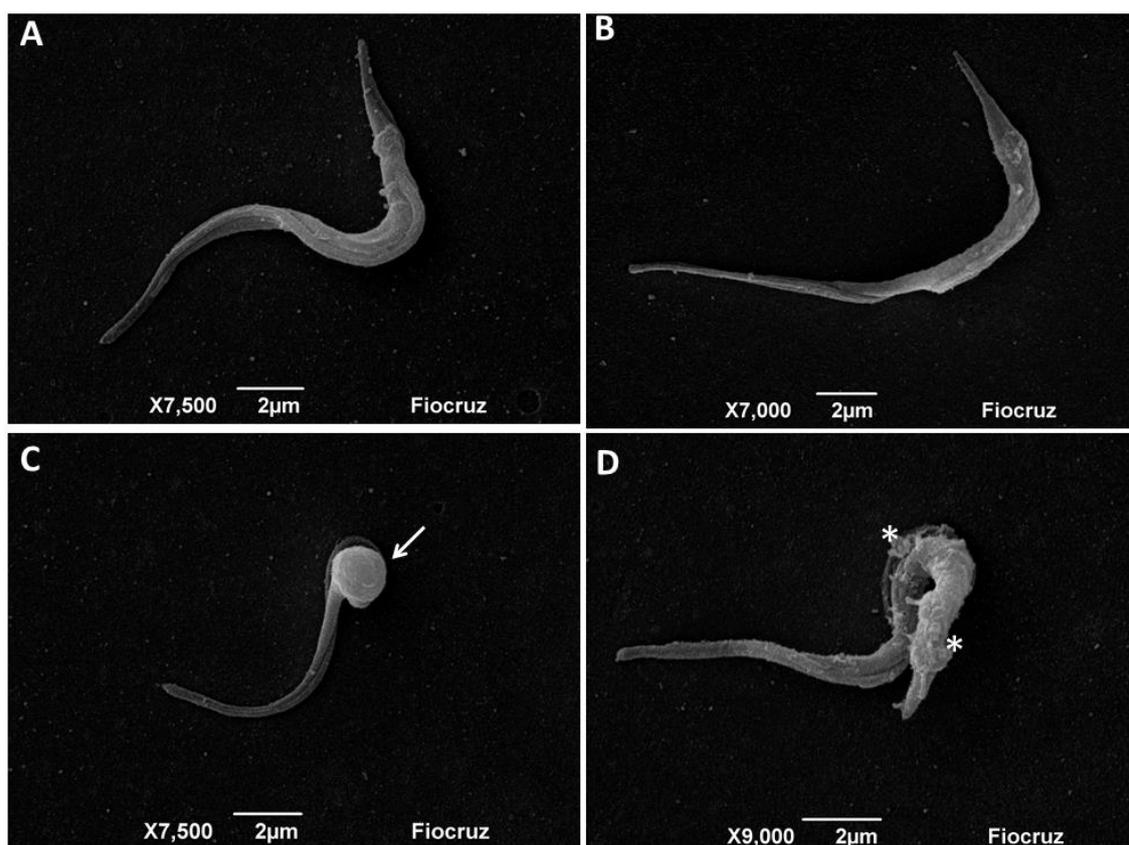


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. (A-B) Controles de formas tripomastigotas apresentando morfologia sem alteração (A) Controle absoluto; (B) Controle DMSO; (C-D) Tripomastigotas tratados com o composto R72 a 15  $\mu$ M, apresentando “retração” do corpo do parasito (seta) e irregularidade na superfície do protozoário (asteriscos).

## 5.5 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA R72 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Com o objetivo de analisar o efeito do composto na ultraestrutura do protozoário, as formas tripomastigotas foram incubadas por 24 horas com o composto R72 a 15  $\mu$ M, como descrito na metodologia. Foi possível observar no controle (Figura 9A) a organização típica da forma tripomastigota de *T. cruzi* com a presença do complexo de Golgi, mitocôndria e retículo endoplasmático sem alteração. Já nos parasitos que foram tratados com o composto R72 observou-se dilatação extrema da bolsa flagelar com grande quantidade de material amorfo (Figura 9B).

Foram observadas, ainda, alterações na mitocôndria e no cinetoplasto (kDNA), com desorganização da arquitetura do material genético (Figura 9C). Na Figura 10A-D observa-se novamente alteração na bolsa flagelar com grande quantidade de material amorfo em seu interior e alterações no cinetoplasto do parasito. Além disso, notamos a presença de membranas concêntricas provavelmente oriundas de cisternas do retículo formando de figuras de mielina (Figura 10C).

Essas alterações são indicativas de processos autofágicos. Contudo verificamos ainda uma eletrodensidade no complexo de Golgi, o que parece justaposto no vacúolo autofágico. Essa observação indica uma alteração na via endocítica do protozoário (Figura 10D). Outra alteração observada foi a presença de corpúsculos lipídicos (CL) (Figura 11A-B), sendo que dois deles estão aparentemente justapostos e um deles apresenta uma íntima associação com a membrana mitocôndrial protundida e além disso, foi possível observar vesícula com conteúdo presumivelmente lipídico no exterior da membrana plasmática protundida (Figura 11B).

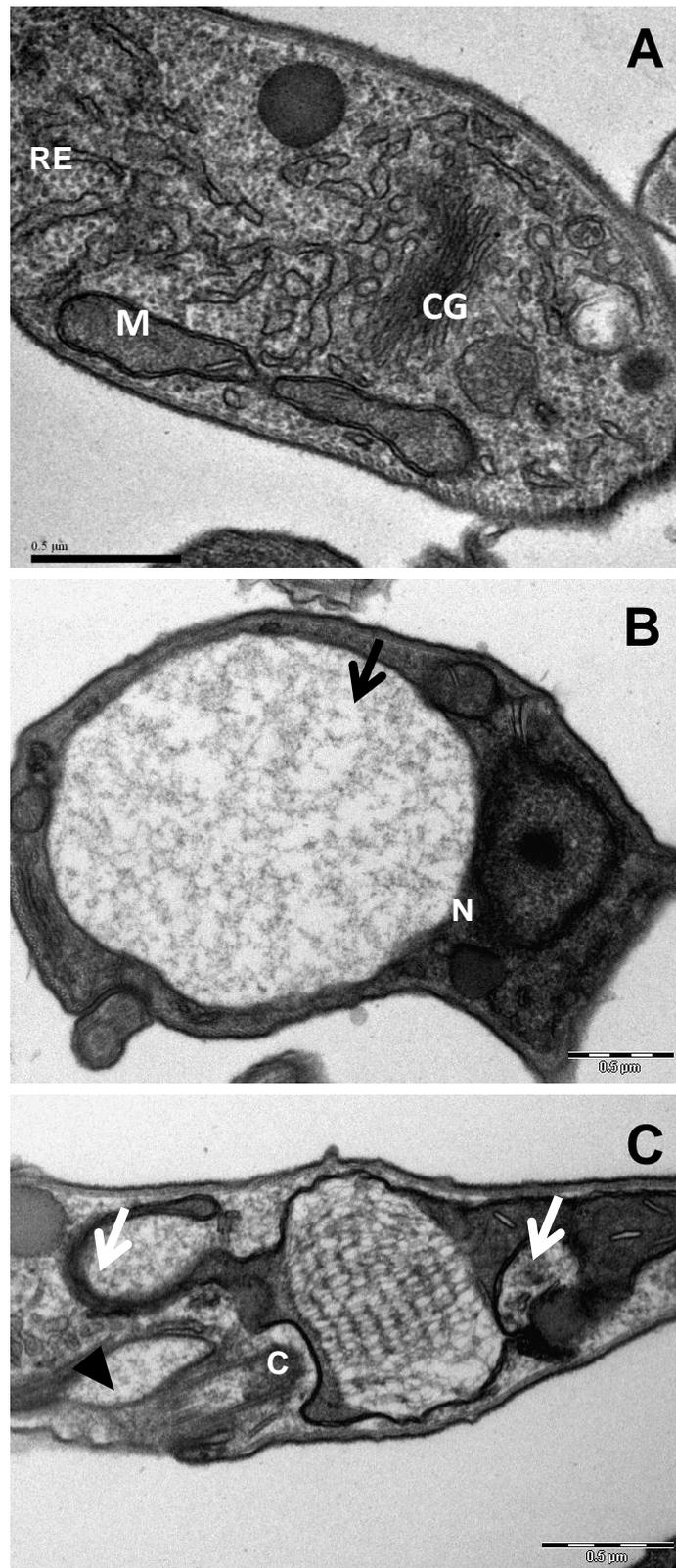


Figura 9. Efeito do composto R72 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de incubação. Em (A) Controle mostrando o parasito sem alterações no reticulo (RE), complexo de Golgi (CG) e mitocôndria (M); (B) dilatação acentuada da bolsa flagelar (seta); (C) desorganização do cinetoplasto e fenestração mitocondrial (setas brancas) e dilatação da bolsa flagelar (ponta de seta).

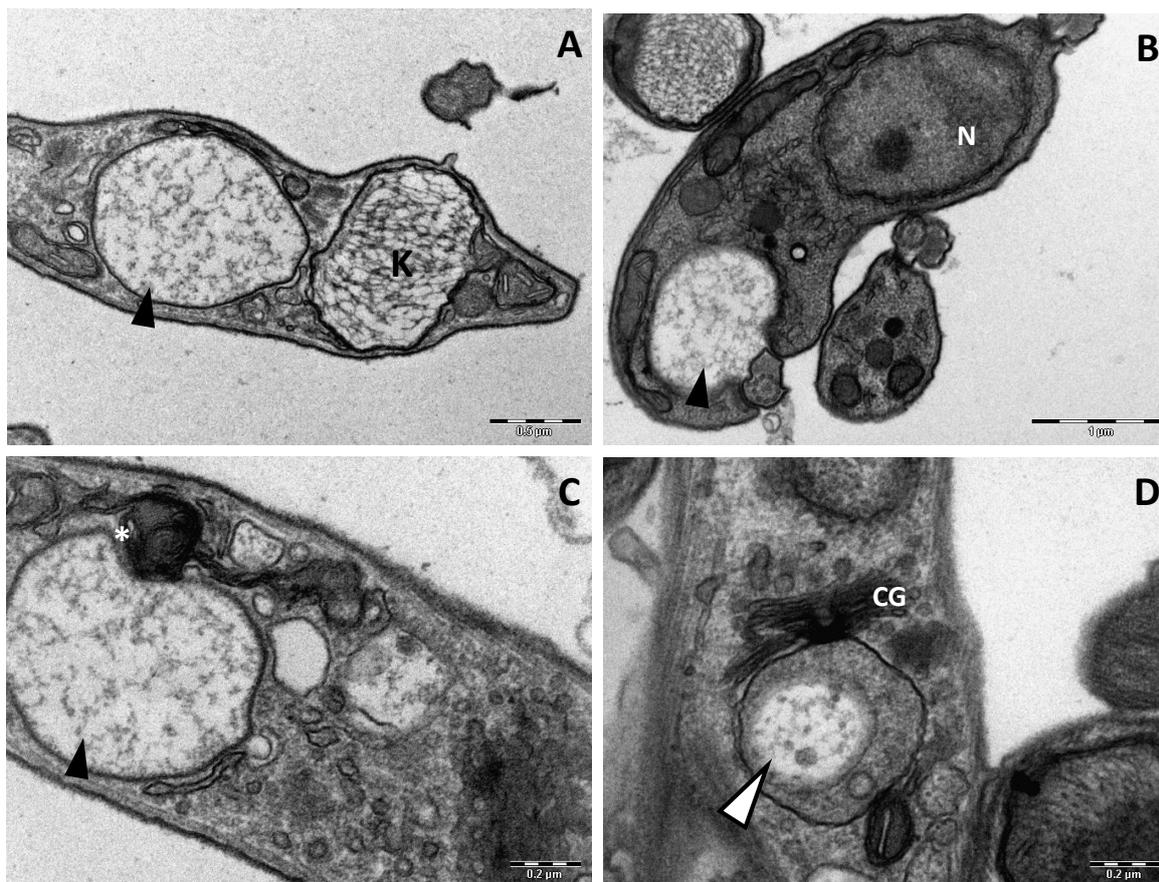


Figura 10. Efeito do composto R72 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de incubação. (A) Dilatação na bolsa flagelar com grande quantidade de material amorfo (pontas de seta pretas) e desorganização do Kinetoplasto (K); (B) Alteração na bolsa flagelar (ponta de seta); (C) Presença de figura de mielina (asterisco branco), indicativo de vacúolos autofágico (ponta de seta branca); (D) Eletrodensidade na face cis do complexo Golgi (CG) justaposto a um vacúolo com material degradado em seu interior.

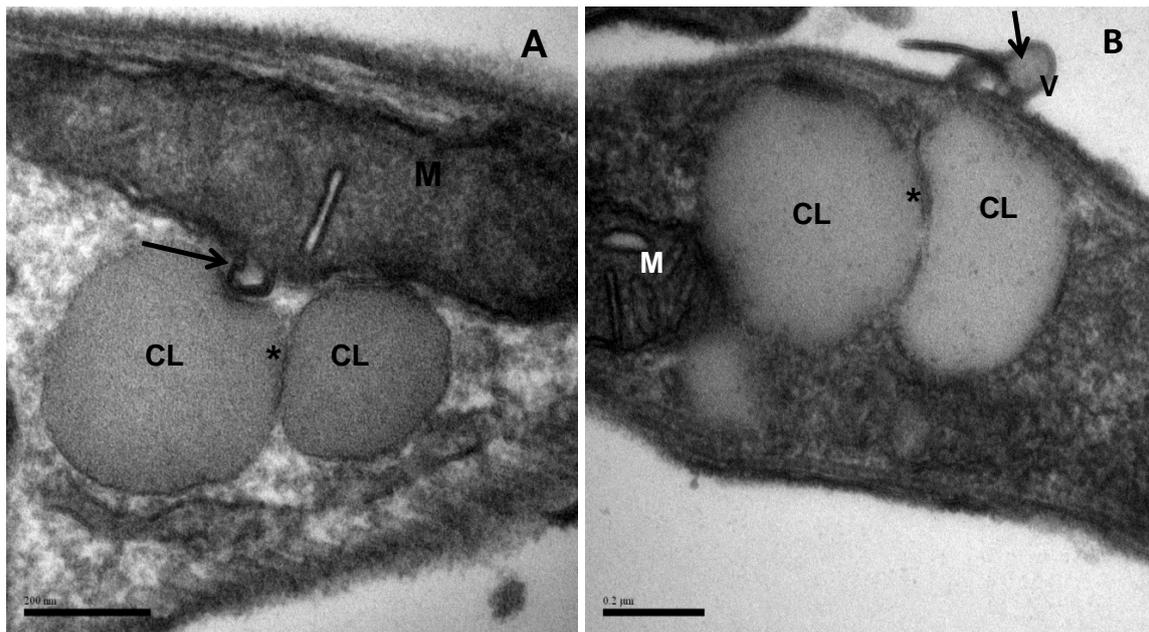


Figura 11. Efeito do composto R72 em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em (A-B) Presença de corpúsculos lipídicos (CL) em associação (asteriscos) e apresentando íntima comunicação com membranas projetadas da mitocôndria (seta preta); (B) Parasito apresentando vesícula (v) indicativa de CL contido em membrana plasmática.

## 5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO NA AUTOFAGIA

Uma vez que a mitocôndria participa de diferentes mecanismos de morte celular, o nosso próximo passo foi investigar se as alterações observadas em *T. cruzi* por microscopia eletrônica eram provenientes de processos autofágicos, para avaliar esse processo as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, após o tratamento com a R72 a 15  $\mu$ M, foram incubadas com monodancilcadaverina (MDC), uma sonda fluorescente e seletiva para vacúolos autofágicos (BIEDERBICK et al., 1995).

A análise por microscopia de fluorescência não indicou marcação positiva no controle após 24 horas de incubação (Figura 12A). No entanto quando analisamos os parasitos após incubação com a rapamicina (controle positivo) e o composto R72, observamos uma marcação pontual. Esse resultado indica que o composto R72 induz autofagia em formas tripomastigotas de *T. cruzi* evidenciada pela marcação positiva da sonda MDC (Figura 12B-C). O tratamento com o composto R72 induziu a presença de vacúolos autofágicos em

cerca de 80% dos enquanto que o controle positivo apresentou 50% de positividade para a sonda (Figura 13).



Figura 12. Microscopia de fluorescência de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com o composto R72 . Em (A) Controle negativo; (B) Controle positivo (rapamicina); (C) parasitos após o tratamento com o composto R72 indicando marcação positiva para sonda MDC.

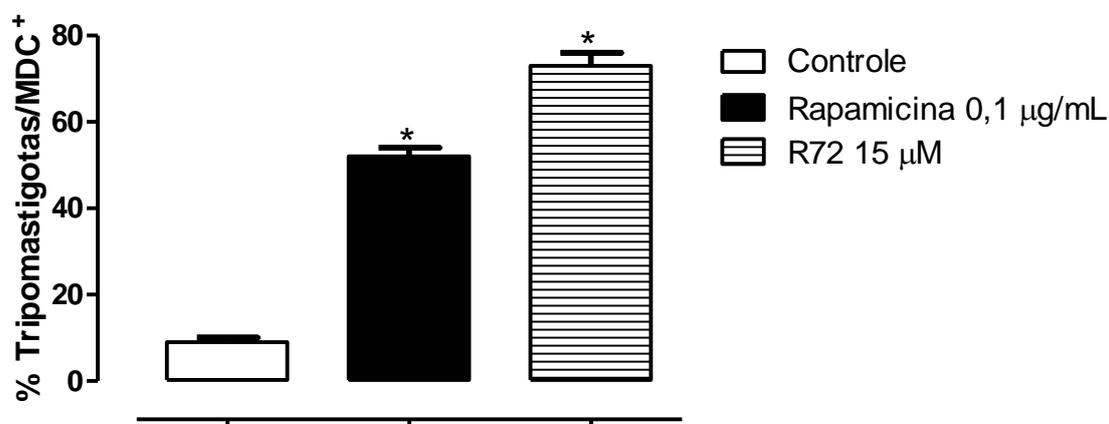


Figura 13. Análise quantitativa por microscopia de fluorescência de tripomastigotas positivos para a sonda MDC após o tratamento com o composto R72 por 24 horas. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicadas para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle, (\*) representa a diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

## 5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO NA APOPTOSE E/OU NECROSE

Além da autofagia nós investigamos se o composto induz apoptose e/ou necrose, visto que esses processos são eventos que ocorrem frequentemente, por indução de compostos derivados de  $\beta$ -lapachona (MENNA-BARRETO et al., 2007, 2009a, 2009b).

A análise por citometria de fluxo de tripomastigotas revelou baixa marcação nos parasitos sem nenhum tratamento (controle) e cerca de 6% nos controles, DMSO com iodeto de propídio (IP), DMSO e Anexina V (AN). No entanto, nos parasitos tratados com a R72 a 15  $\mu$ M observamos 73,2% de marcação positiva para a sonda AN e 38,3% para IP (Figura 14). Esses resultados confirmam as alterações observadas pela MET e fornece forte evidência que o composto induz alterações no parasito que deflagram a morte por apoptose. Entretanto aproximadamente um-terço dos parasitos entram em necrose como mostra a marcação por IP. A marcação positiva de parasitos para as sondas AN e IP indica que o composto induz a dois mecanismos distintos de morte nos parasitos (MENNA-BARRETO et al., 2009b).

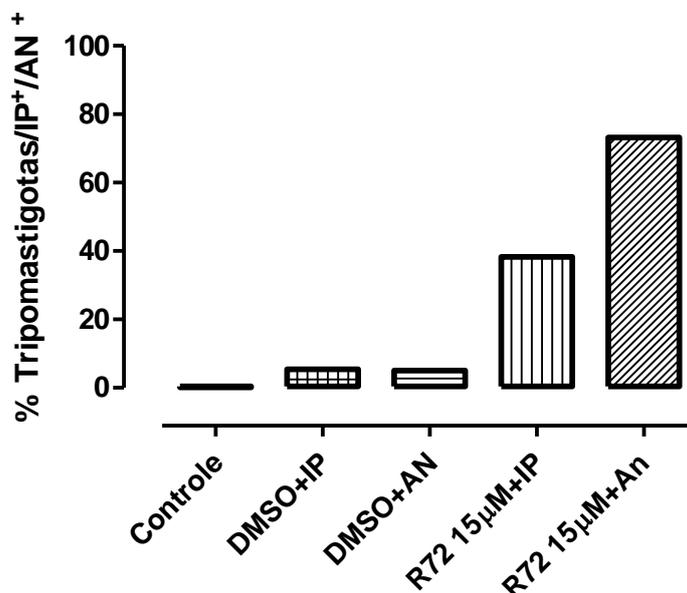


Figura 14. Tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com o composto R72 por 24 horas e incubados com anexina V e iodeto de propídio e quantificados por citometria de fluxo. Podemos observar uma baixa marcação nos controles e cerca de 70% e 40% de marcação nos tratamentos respectivamente.

## 5.8 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar a produção EROs no envolvimento dos processos autofágicos e apoptóticos/necróticos em *T. cruzi* após o tratamento com o composto R72 a 15  $\mu\text{M}$ , incubamos os parasitos com dihidroetídio (DHE), uma sonda fluorescente que tem afinidade ao radical superóxido (SLANE et al., 2006).

A análise por microscopia de fluorescência não demonstrou marcação positiva nos controles (parasito sem tratamento) (Figura 15A-B). No entanto observamos marcação pontual nos parasitos tratados com composto R72 após 24 horas de incubação (Figura 15C). Essa marcação foi quantificada por citometria de fluxo e revelou 40% de parasitos marcados para sonda DHE (Figura 16), indicando que o composto induz a produção de EROs nos parasitos após o tratamento com o composto R72.



Figura 15. Microscopia de fluorescência de tripomastigotas tratados com o composto R72 a 15  $\mu\text{M}$  após 24 horas. Em (A) Controle; (B) Controle DMSO; (C) Parasitos após o tratamento com o composto R72 observar marcação pontual.

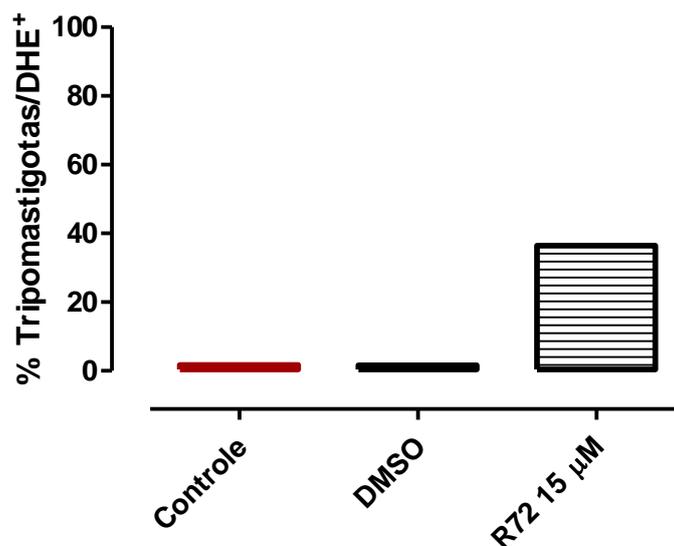


Figura 16. Quantificação da produção de ERO por citometria de fluxo em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com 15 µM de R72 e 30 minutos com DHE.

### 5.9 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE EM CULTURAS DE ESLENÓCITOS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A viabilidade das células após 24 horas de incubação com a R72 em diferentes concentrações foi avaliada pelo método do MTT como descrito no item 4.10. De acordo com o resultado obtido, o composto não apresentou toxicidade significativa em concentrações inferiores a 200 µM para as culturas de esplenócitos e macrófagos, quando comparados ao controle DMSO. Somente a partir dessa concentração o composto alterou a viabilidade das células (Figura 17A-B). O ensaio do composto R72 em ambas as culturas demonstrou efeito concentração-dependente, apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 212 µM para a cultura de esplenócitos e de 253 µM para cultura de macrófagos.

Esses resultados foram importantes para iniciar o estudo de formas intracelulares de *T. cruzi in vitro*, visto que as concentrações de 15 e 50 µM que foram utilizadas nesse estudo são seletivas *in vitro* apresentaram toxicidade apenas para as formas tripomastigotas. Além disso, com os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nas culturas de células de mamíferos e em formas tripomastigotas de *T.*

*cruzi* na curva de inibição, encontramos índice de seletividade (IS) superior a 14 (Tabela 1), isso significa que o composto é altamente seletivo para as células de mamíferos e apresenta uma toxicidade de 14 vezes maior para o parasito do que para a célula de mamífero.

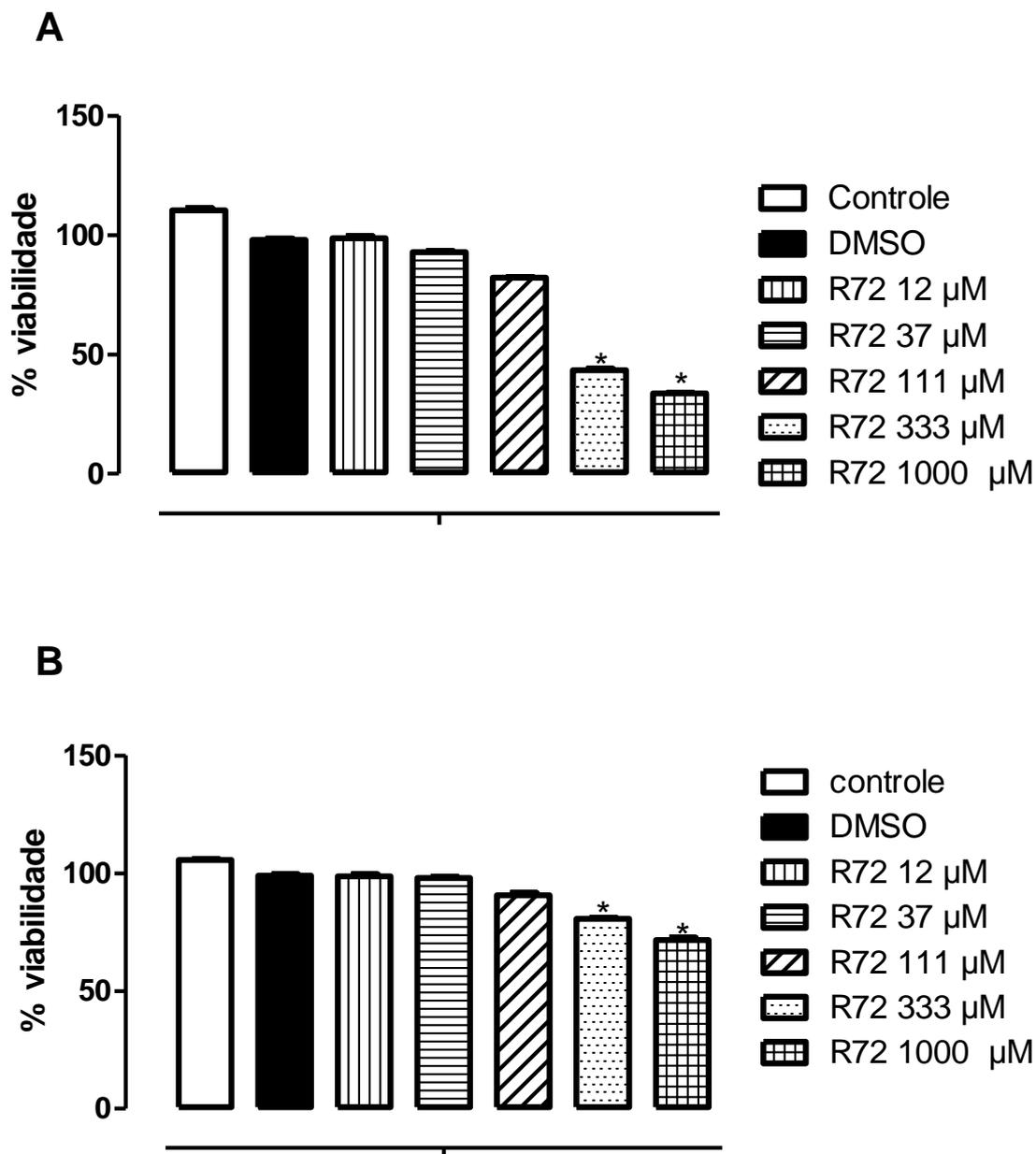


Figura 17. Avaliação da viabilidade celular em culturas de células de mamíferos pelo método do MTT, determinado a 570 nm após 24 horas de incubação com o composto R72 em diferentes concentrações: Valores em porcentagem do número de células viáveis, (A) Cultura de esplenócitos e (B) Macrófagos peritoneais murinos. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicados para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle DMSO, (\*) representa diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

Tabela 1. Valores de IC<sub>50</sub> e índice de seletividade em esplenócitos, macrófagos e *T. cruzi*.

<b>Células</b>	<b>IC50 (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Índice de Seletividade (IS)</b>
Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	15	–
Macrófagos	253	16,9
Esplenócitos	212	14,1

#### 5.10 EFEITO DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS PELO *T. cruzi*

Após verificarmos que o composto apresentou toxicidade para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e que não apresentou toxicidade para as células de mamíferos em concentrações inferiores a 200  $\mu$ M. Realizamos um ensaio para verificar se o composto apresenta atividade tripanocida em culturas de macrófagos infectados com o *T. cruzi*.

Em macrófagos infectados não tratados (controle negativo), observamos cerca de 90% de células infectadas. No controle positivo (Controle Benzonidazol) observamos redução de 50% no número de células infectadas. No entanto, quando tratamos os macrófagos infectados com 50  $\mu$ M de R72 verificamos que a percentagem de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófagos foram significativamente ( $p < 0,05$ ) reduzidos (cerca de 80%) após 48 horas de incubação com o composto, quando comparado aos controles (Figuras 18 e 19).

Na Figura 20A-B podemos observar o citoplasma dos macrófagos repletos de parasitos nos controles, demonstrando que as formas tripomastigotas completam o ciclo intracelular e após o tratamento verificamos redução significativa de amastigotas no citoplasma da célula hospedeira (Figura 20C),

indicando que o composto interfere na proliferação de formas amastigotas de *T. cruzi*. Assim, novos experimentos foram realizados para avaliar efeito ultraestrutural do composto na infecção *in vitro*.

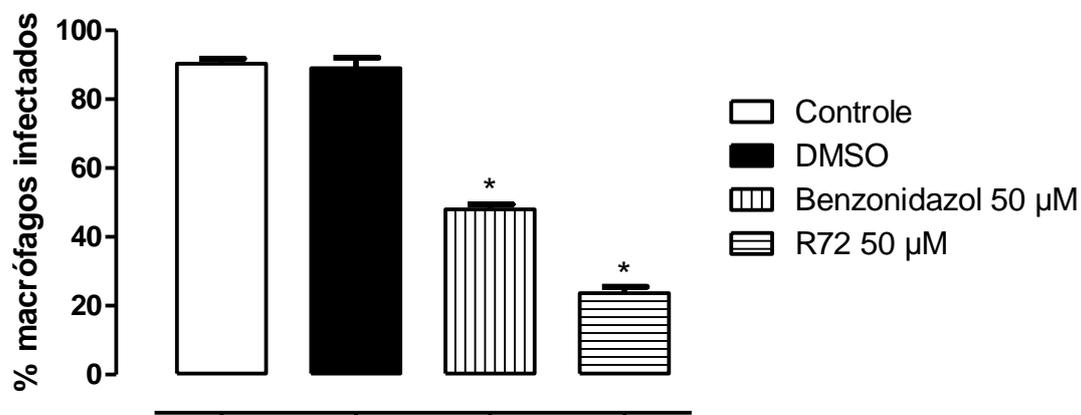


Figura 18. Efeito do composto derivado de  $\beta$ -lapachona R72 na interação parasito/macrófago, o benzonidazol foi usado como controle positivo. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicados para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle DMSO, (\*) representa diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

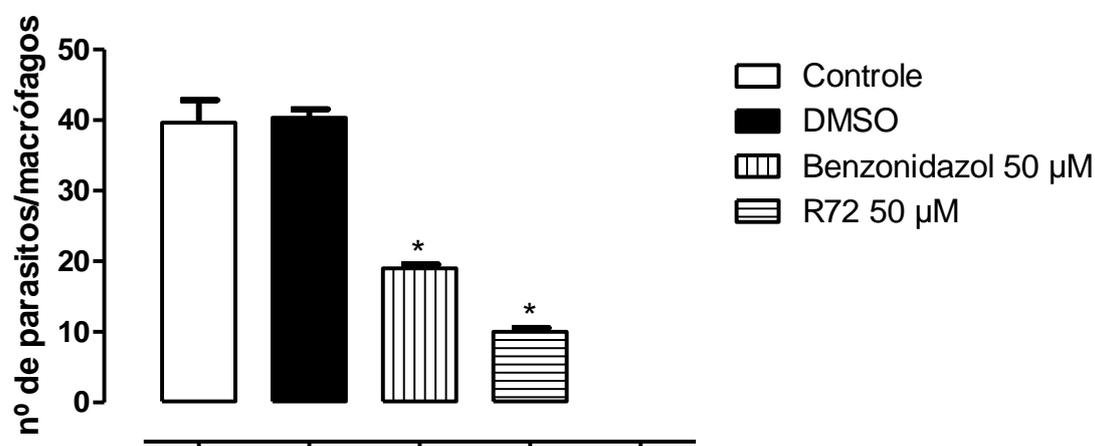


Figura 19. Efeito do composto derivado de  $\beta$ -lapachona R72 na interação parasito/macrófago, o benzonidazol foi usado como controle positivo. O número de parasitos por macrófagos foi determinado por contagem de 100 células por lamínulas após coloração com hematoxilina e eosina. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicados para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle DMSO, (\*) representa diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

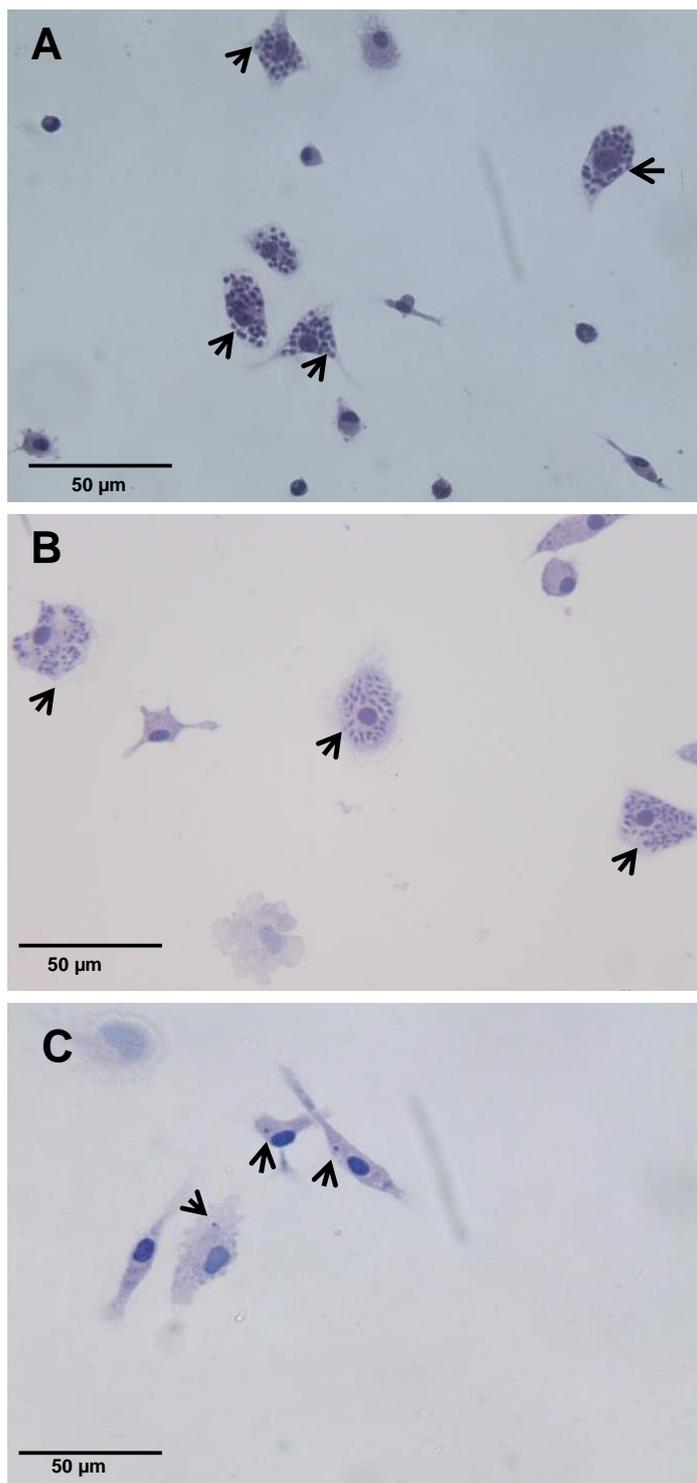


Figura 20. Fotomicrografias da interação parasitos/macrófagos, (A) controle negativo; (B) Controle DMSO; (C) observar redução de parasitos no citoplasma de macrófagos após tratamento com R72 (setas), células coradas pela hematoxilina e eosina.

### 5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPOSTO R72 EM MACRÓFAGOS ANTES DA INTERAÇÃO COM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Com o objetivo de analisar se o composto R72 interfere nos processos de adesão e internalização de *T. cruzi*, os macrófagos foram previamente tratados com o composto R72 a 50  $\mu$ M e infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e incubados na presença ou ausência do composto. Podemos observar que o composto não alterou o índice de adesão dos parasitos aos macrófagos, no entanto o índice de internalização dos parasitos pelos macrófagos preincubados por 30 minutos com o composto R72 foi significativamente reduzido quando comparado ao controle DMSO (Figura 21).

Através da análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura não visualizamos a presença de tripomastigotas aderidos no controle (Figura 22A). Esse dado indica que devido ao tempo de incubação os parasitos foram totalmente internalizados. Em macrófagos tratados previamente com o composto notamos ainda à presença de parasitos aderidos na superfície do fagócito (Figura 22B-C), indicando que o composto inibe a internalização de tripomastigotas em macrófagos tratados previamente a interação. Desta forma este resultado corrobora os resultados obtidos na Figura 21.

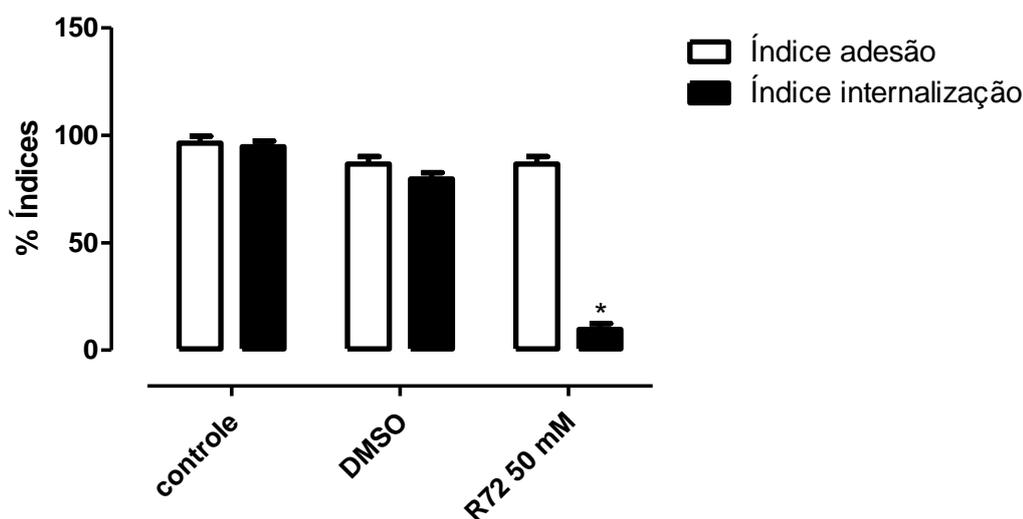


Figura 21. Índice de adesão e internalização em macrófagos tratados previamente à interação com tripomastigotas de *T. cruzi*. O composto reduziu o processo de internalização do parasito pelo macrófago após o tratamento prévio. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicados para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle e ao controle DMSO, (\*) representa diferença estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

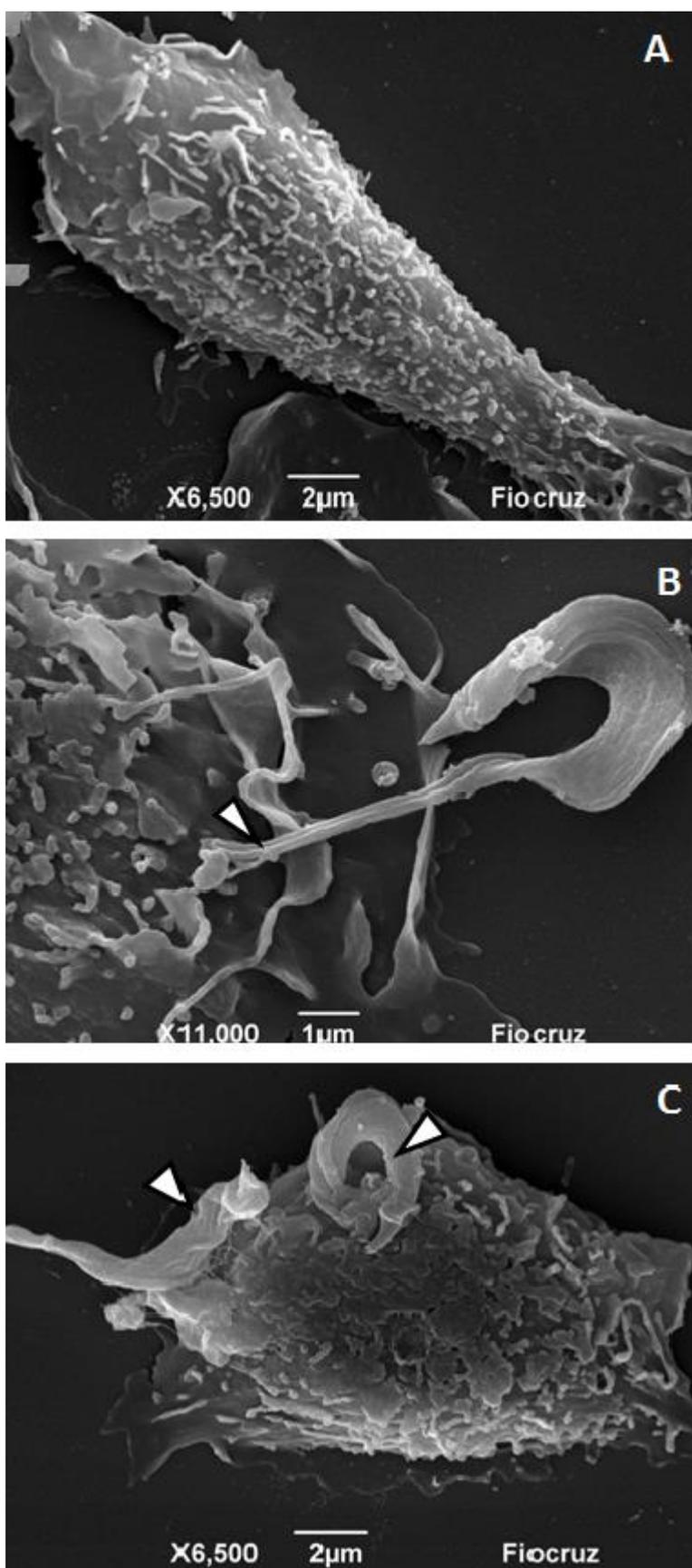


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura de macrófagos tratados e infectados com *T. cruzi*. Em (A) controle; (B-C) observar a inibição da internalização após o tratamento dos macrófagos com o composto (R72).

## 5.12 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DO COMPOSTO DERIVADO DE $\beta$ -LAPACHONA R72 NA INTERAÇÃO PARASITO/MACRÓFAGO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para verificar o efeito ultraestrutural do composto R72 na interação parasito/macrófago por microscopia eletrônica de transmissão. Os macrófagos foram incubados com tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 10:1 parasitos/macrófagos.

Observamos os macrófagos sem alteração na Figura 23A, e após o tratamento, podemos evidenciar um processo de autofagia caracterizado pela presença de vacúolos autofágicos (VA) contendo membranas concêntricas ou figuras de mielina, além disso, podemos observar membranas oriundas do retículo endoplasmático (RE) envolvendo mitocôndria para degradação indicando um processo de macroautofagia (Figura 23B-D).

Na Figura 24A observamos os macrófagos incubados com parasitos sem tratamento (controle) por 72 horas, observamos o citoplasma do macrófago com muitos parasitos no interior de vacúolos parasitóforos. Na Figura 24B observamos macrófagos infectados com *T. cruzi* e incubados com DMSO também verificamos a presença de *T. cruzi* do fagócito. Podemos observar nas figuras 24C e 24D o efeito do composto R72 na interação parasito/macrófago evidenciando redução do número de parasitos no citoplasma do macrófago após o tratamento com o composto, além disso, é possível evidenciar a presença de numerosos corpúsculos lipídicos, formação de membranas concêntricas provavelmente oriundas do retículo endoplasmático, indicando um processo autofágico.

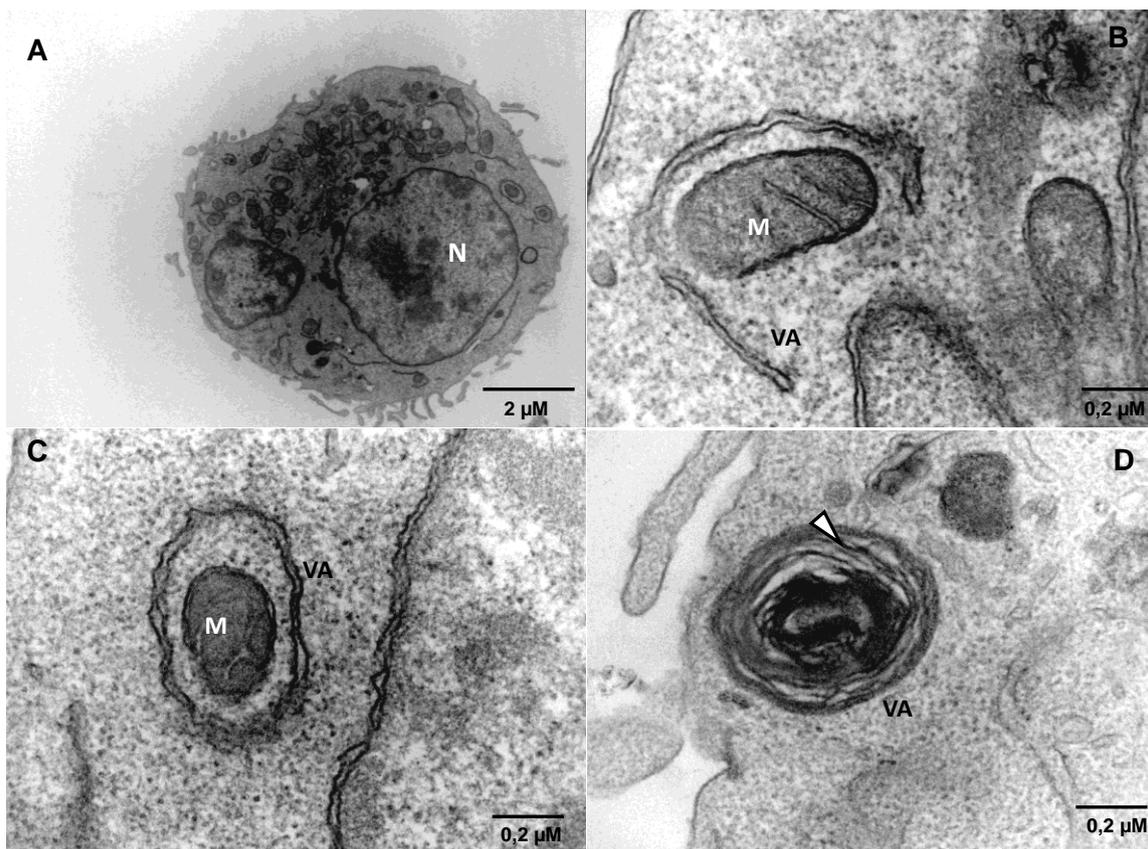


Figura 23. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos incubados com tripomastigotas de *T. cruzi* por 2 horas e tratados por 24 horas com a R72 a 50 μM. (A) Controle célula sem alteração aparente. (B-D) Células após tratamento com formação de vacúolos autofágicos pelo envolvimento de mitocôndrias (M) por cisternas de retículo endoplasmático (B e C) e de figuras de mielina (D).

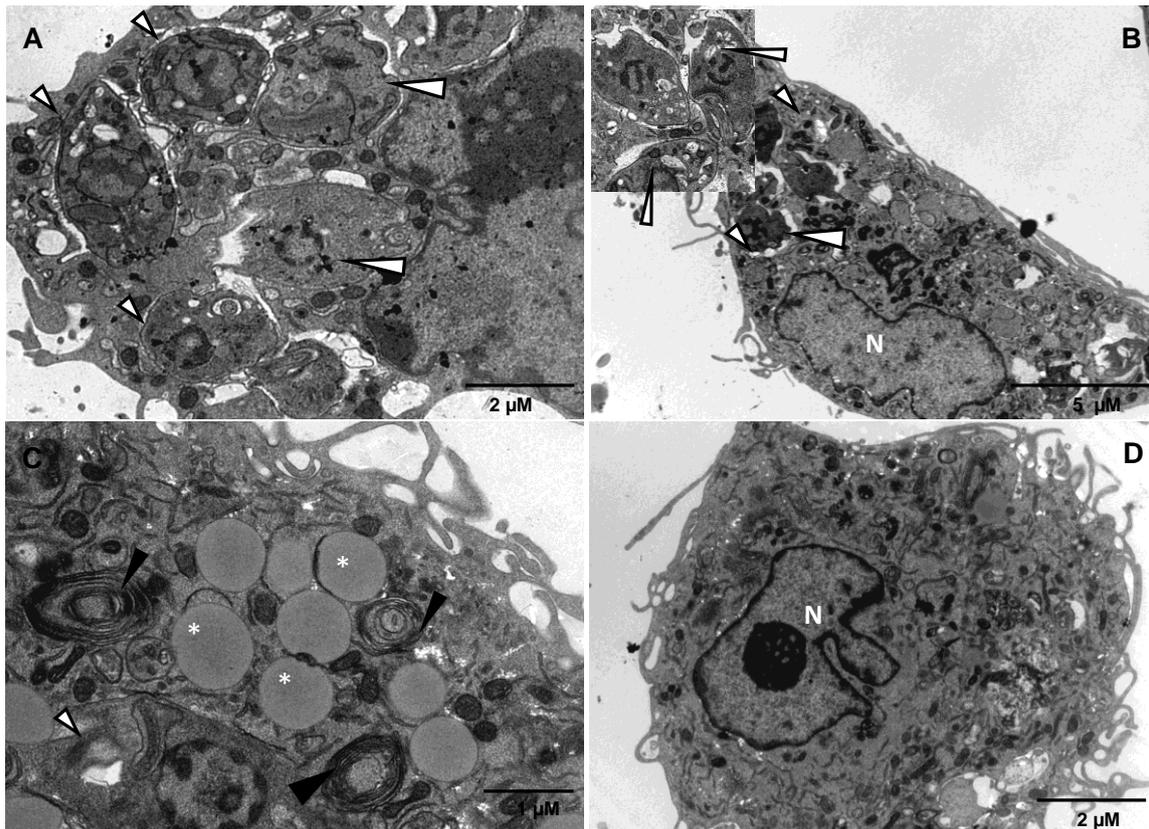


Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos incubados com tripomastigotas de *T. cruzi* por 2 horas e tratados por 72 horas com a R72 a 50  $\mu$ M. (A) Controle (B) controle DMSO ambos com presença de muitos parasitos no citoplasma da célula (pontas de setas). (C-D) Interação parasito/macrófago após tratamento com R72 indicando a formação de corpúsculos lipídicos (asteriscos) e membranas concêntricas (pontas de seta pretas).

### 5.13 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA INTERAÇÃO PARASITO/MACRÓFAGO E POR MACRÓFAGOS J774

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pelos níveis de nitrito gerados no sobrenadante das culturas (macrófagos e da interação parasito/macrófago). Podemos observar na Figura 25 que não houve produção de NO nas células sem tratamento (controle). Verificamos nas células incubadas com LPS e IFN- $\gamma$  (controle positivo) aumento significativo na produção de NO pelos macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$ , enquanto que nas células incubadas com LPS, IFN- $\gamma$  e R72, não houve produção significativa de NO pelos macrófagos após o tratamento com a R72. Este resultado indica que o composto sozinho não modula a produção de NO pelos macrófagos e quando incubados

com LPS, IFN- $\gamma$  e R72 houve inibição da produção de NO. Não houve alteração significativa dos níveis de NO pelos macrófagos após o tratamento com a R72, quando comparado ao controle negativo (Figuras 25).

Nos macrófagos infectados com o *T. cruzi* e incubados com LPS e IFN- $\gamma$  (controle positivo) verificamos aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de nitrito, em torno de 10  $\mu\text{M}$ . A concentração de nitrito foi reduzida para 4  $\mu\text{M}$  quando as culturas foram incubadas com LPS, IFN- $\gamma$  e R72. No entanto, quando as culturas são tratadas com a R72 não há produção significativa de NO pelos macrófagos infectados (Figura 26).

Desse modo podemos inferir que em macrófagos ativados o tratamento com R72 modula negativamente a detecção de NO nos sobrenadantes das culturas.

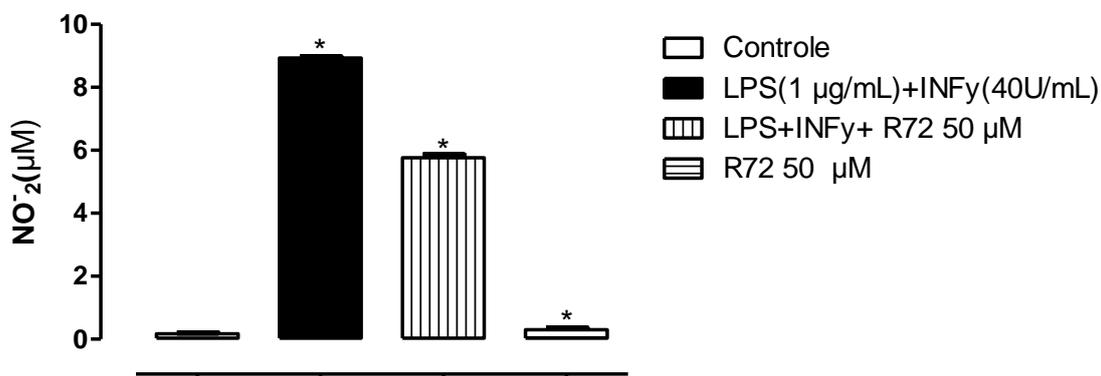


Figura 25. Produção de NO por macrófagos J774. As células foram incubadas com LPS, LPS, IFN- $\gamma$  e R72, R72 ou sem estímulos (controle negativo). Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados e os níveis de NO foram quantificados no espectrofotômetro a 540 nm, pelo método de Griess. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicados para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle positivo (LPS e INF $\gamma$ ), (\*) representa diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

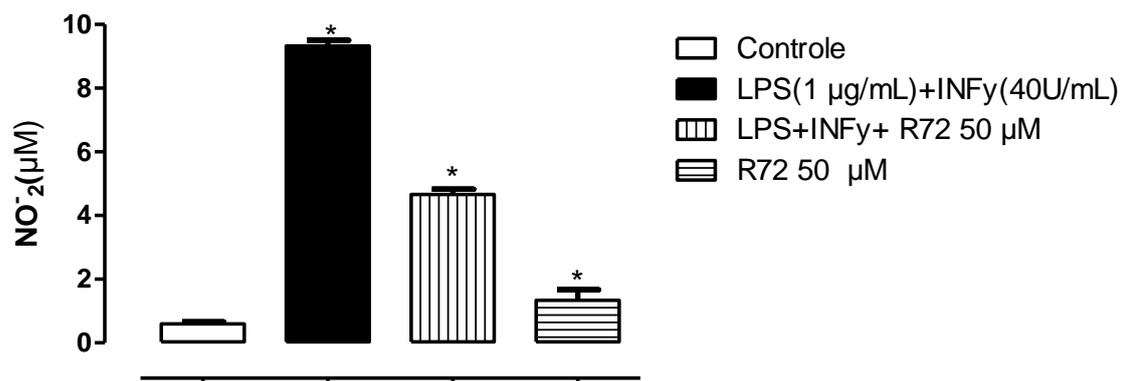


Figura 26. Produção de NO na infecção parasito/macrófagos J774. As células foram incubadas com LPS, LPS, INF $\gamma$  e R72, R72 ou sem estímulos (controle negativo). Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados e os níveis de NO foram quantificados no espectrofotômetro a 540 nm, pelo método de Griess. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram aplicados para determinar a significância estatística entre os tratamentos em relação ao controle positivo (LPS e INF $\gamma$ ), (\*) representa diferença estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

Os compostos derivados de  $\beta$ -lapachona apresentam importante atividade anti-inflamatória e anticâncer (PARDEE et al., 2002). Em modelos celulares, a atividade da  $\beta$ -lapachona sobre *T. cruzi* foi investigada inicialmente por Boveris et al. (1978) e Docampo et al. (1978), que demonstraram o efeito tóxico do composto sobre o protozoário.

Segundo Goijman e Stoppani (1985) os compostos derivados de  $\beta$ -lapachona interagem com as macromoléculas de *Trypanosoma cruzi* e induzem a formação de peróxido de hidrogênio e degradação de macromoléculas como RNA, DNA e proteínas. A presença destes radicais no interior das células pode levar a danos irreversíveis devido à ligação destes radicais com macromoléculas importantes da célula.

De acordo os resultados obtidos nesse estudo, o composto foi capaz de inibir cerca de 80% do número de parasitos viáveis, produzindo  $IC_{50}$  de 15  $\mu$ M e causando intensas alterações morfológicas e bioquímicas para a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Em estudos realizados por Anjos (2009) a  $IC_{50}$  para a forma epimastigota foi superior a 15  $\mu$ M, após 96 horas de incubação com o composto R72. Esse resultado demonstra que o composto apresenta maior toxicidade para a forma tripomastigota do que para a forma epimastigota, além disso, em experimentos realizados para avaliar a viabilidade do parasito, após incubação com o composto em concentrações que variaram de 12 a 1000  $\mu$ M, foi observada perda de viabilidade do protozoário, evidenciada pela inibição da redução de MTT a formazan.

Segundo Mosmann (1983) quando as células estão viáveis, as desidrogenases mitocondriais reduzem o sal MTT a formazan, no entanto outros compartimentos celulares podem participar da produção de formazan (LIU et al., 1997; STOCKERT et al., 2012). A produção de formazan nos parasitos após o tratamento com o composto foi reduzida significativamente, indicando desta forma que o composto afetou a função mitocondrial e o balanço redox do

parasito, resultando em perda da atividade respiratória e possível dilatação mitocondrial. O efeito concentração-dependente da R72 foi devido à alteração na função redox, com o aumento da concentração do composto, evidenciada pelo método do MTT.

As técnicas de microscopia eletrônica constituem ferramentas muito utilizadas para verificar o efeito de compostos na ultraestrutura de protozoários (VANNIER-SANTOS e LINS, 2001; VANNIER-SANTOS et al., 2002; VANNIER-SANTOS e CASTRO 2009; RODRIGUES E SOUZA, 2008; MENNA-BARRETO et al., 2009; 2009b). Sendo assim, empregamos estas técnicas para elucidar o mecanismo de ação da R72 na organização ultraestrutural das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Avaliações ultraestruturais confirmaram alteração na topologia do protozoário, assim como dilatação em organelas importantes do parasito tais como: bolsa flagelar, cinetoplasto e mitocôndria. A bolsa flagelar é uma estrutura muito importante para ingestão e exocitose pelo parasito (DE SOUZA, 2008), as alterações evidenciadas neste compartimento sugerem um comprometimento da(s) via(s) endocítica e/ou exocítica do protozoário.

Em experimentos realizados com as formas epimastigotas de *T. cruzi* incubados com LDL ou com uma proteína marcada com ouro coloidal demonstraram que estas macromoléculas são incorporadas via vesículas, formadas no citóstoma ou na bolsa flagelar. Estudos similares realizados com *T. brucei* e *Leishmania* demonstraram que a atividade endocítica ocorre na bolsa flagelar (FIELD e CARRINGTON, 2004). Uma dilatação acentuada na bolsa flagelar de *T. cruzi* também foi observada em parasitos tratados com agentes que afetam o citoesqueleto, como o taxol (BAUM et al., 1981; DANTAS et al., 2003). Em *Leishmania amazonensis* o promotor de tumor TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) também é capaz de modular a exocitose e aumentar a área da bolsa flagelar (VANNIER-SANTOS et al., 1988). Segundo Li et al. (1999) a combinação da  $\beta$ -lapachona com o taxol apresenta potente atividade anti-tumoral, que afeta pontos específicos da divisão celular resultando em morte da célula por apoptose.

Desse modo, alterações da bolsa flagelar podem resultar em um estresse nutricional e ativação de diferentes vias de morte em *T. cruzi*, envolvendo o cinetoplasto e a mitocôndria. Estudos demonstraram que estas organelas são frequentemente afetadas após o tratamento com compostos derivados de  $\beta$ -lapachona (MENNA-BARRETO et al., 2005; 2007; 2009a). Além das alterações observadas nas organelas citadas acima, notamos ainda no citoplasma do parasito a formação de corpúsculos lipídicos (Figura 11A-B) e figuras de mielina (Figura 10A), sugerindo o envolvimento de eventos autofágicos no mecanismo de ação deste composto, o qual foi confirmado pela sonda MDC.

A autofagia envolve a formação de uma estrutura de dupla membrana, a partir do retículo endoplasmático chamada de autofagossomo ou vacúolo autofágico, para seqüestrar organelas e/ou estruturas citoplasmáticas. Posteriormente o vacúolo autofágico funde-se com o lisossomo formando um autofagolisossomo para degradação e reciclagem de macromoléculas (KLIONSKY, 1999; LEVINE e KLIONSKY, 2004; XIE e KLIONSKY, 2007). Este processo é essencial para manter a homeostase de um organismo (YORIMITSU et al., 2006; ALVAREZ et al., 2008) e para reciclagem de estruturas celulares. No entanto, quando a capacidade autofágica não consegue estabelecer o equilíbrio homeostático, a célula pode ativar diferentes mecanismos de morte (REGGIORI e KLIONSKY, 2002).

A pesquisa de genes relacionados com a autofagia nos genomas de tripanosomatídeos revelou a presença de genes ATGs (HERMAN et al., 2006). Durante a privação de nutrientes, o gene Atg8.1 (TcATG8.1) foi localizado por imunofluorescência em vesículas semelhantes a autofagossomas (ALVAREZ et al., 2008). A autofagia em *T. cruzi* está envolvida no processo de diferenciação entre as formas evolutivas do protozoário, sendo um importante processo para manutenção, sobrevivência e infectividade do parasito (BRENNAND et al., 2011). Alguns estudos indicam que a autofagia ocorre em *T. cruzi* como um mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro (DENNINGER et al., 2008).

Em estudos realizados por Menna-Barreto et al. (2009a) com três naftoimidazóis derivados de  $\beta$ -lapachona, designados como N1, N2 e N3,

demonstraram alta atividade em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares. Em epimastigotas o composto bloqueou o ciclo celular e induziu danos em organelas importantes como mitocôndria, complexo de Golgi e reservossomos. Em tripomastigotas o composto causou alterações no cinetoplasto, mitocôndria, na membrana plasmática e fragmentação de DNA (MENNA-BARRETO et al., 2007). Nesse trabalho o fenótipo de morte predominante foi a autofagia.

Recentemente Fernandes e colaboradores (2012) demonstraram que quando os parasitos são tratados com diferentes concentrações de naftoquinona, o composto induz o aparecimento de membranas concêntricas, oriundas do retículo endoplasmático formando figuras de mielina, confirmando fenótipo de morte autofágica. Em nosso trabalho, a autofagia induzida pela R72 foi confirmada pelo aumento no número de parasitos contendo vacúolos autofágicos, cerca de aproximadamente 40%, os quais foram identificados através da marcação positiva para a sonda fluorescente MDC.

Além da autofagia confirmada em nossos resultados, resolvemos investigar se o composto induz a morte de *T. cruzi* por apoptose e/ou necrose, visto que observamos pela microscopia eletrônica, alteração mitocondrial e esta organela apresenta papel central em ambos os processos de apoptose e necrose (SCHERZ-SHOUVAL e ELAZAR, 2007; SCHERZ-SHOUVAL et al., 2007; MENNA-BARRETO et al., 2009a; PARK et al., 2011). A análise por citometria de fluxo confirmou que o composto induziu a morte dos parasitos tanto por apoptose, quanto por necrose.

A apoptose está envolvida na regulação da homeostase do organismo, apresentando um papel importante na renovação de células mortas ou danificadas, em organismos pluricelulares (SCHAUMBURG et al., 2006).

O mecanismo apoptótico pode ocorrer em condições fisiológicas ou associadas a estímulos exógenos, como radiação ultravioleta e vários produtos químicos, incluindo drogas (SEN, 1992). Em condições normais, as células apresentam o fosfolípido fosfatidilserina no folheto citoplasmático da membrana celular (BODEY et al., 1998). Quando a célula tem deflagrado o processo de

apoptose, ela passa a expressar esse fosfolípido no folheto externo da membrana celular. Assim, diante dessas características citadas acima, foi possível sugerir o tipo de morte do protozoário a partir de dados da citometria de fluxo, utilizando uma sonda fluorescente que se liga à fosfatidilserina (WLODKOMIC et al., 2009).

Com base nos resultados da análise por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo, observou-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), está envolvida no mecanismo de ação do composto R72, o qual foi confirmado pela sonda DHE. Nas condições experimentais empregadas, o efeito tóxico da  $\beta$ -lapachona (R72) sob formas tripomastigotas de *T. cruzi* ocorreu devido à produção de EROs, a qual pode induzir apoptose em diferentes tipos celulares (DUBIN et al., 2001; ZHANG et al., 2014).

Os compostos derivados de  $\beta$ -lapachona estimulam a produção de EROs (BOVERIS et al. 1978; DOCAMPO et al. 1978) causando autofagia (MENNA-BARRETO et al., 2009a), apoptose (DI ROSSO et al., 2013) e necrose (PARK et al., 2014). Tais resultados corroboram dados da literatura, que demonstram a atividade de derivados de  $\beta$ -lapachona em diversos tipos celulares, inclusive em *T. cruzi* (MENNA-BARRETO et al., 2009; BOVERIS et al. 1978; DOCAMPO et al. 1978).

Nesse trabalho o composto derivado de  $\beta$ -lapachona R72 induziu a produção de EROs, que desencadeou processos de autofagia, apoptose além de necrose. Esses mecanismos de mortes também foram observados em outros trabalhos (MENNA-BARRETO et al., 2005; MENNA-BARRETO et al., 2007; MENNA-BARRETO et al., 2008; RODRIGUES e DESOUZA, 2008; VANNIER-SANTOS e CASTRO, 2009). A morte celular por necrose também pode ser programada (GUIMARÃES e LINDEM, 2004). Recentemente Park et al. (2014) demonstraram que a  $\beta$ -lapachona induz necrose programada, fenômeno denominado de necroptose, em células de carcinoma hepático humano, por uma via independente da ativação de caspase e dependente de ativação de RIP1 (receptor de interação com a proteína 1), via geração de EROs nestas células.

Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem evidências da possibilidade de utilização desse composto como alternativa no controle de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Além disso, Pinto e Castro (2009) demonstraram que um derivado de  $\beta$ -lapachona apresenta baixa toxicidade para a célula hospedeira, por causa da interação do composto com as proteínas do soro e também por interagir com a oxihemoglobina.

A  $\beta$ -lapachona apresenta citotoxicidade antitumoral (FERREIRA et al., 2010; LI et al., 1989; LI et al., 1999; LI et al., 2003; LAMBERTI et al., 2013) e antiparasitária (MENNA-BARRETO et al., 2005, 2009; DA ROCHA et al., 2013). Desse modo, antes de avaliar o efeito do composto, na interação parasito/macrófago *in vitro*, realizamos experimentos para avaliar se o composto inédito R72 apresenta citotoxicidade em culturas de esplenócitos e macrófagos, e verificamos efeito citotóxico significativo a partir da concentração de 333  $\mu$ M para ambos tipos celulares (esplenócitos e macrófagos). Isso sugere, que em concentrações inferiores a 333  $\mu$ M, o composto não promove alteração na atividade mitocondrial das células. Sendo assim podemos inferir que o composto R72 não é citotóxico para as células de mamíferos.

O resultado é bastante interessante, pois o valor de  $IC_{50}$  obtido no teste de citotoxicidade foi cerca de 11 vezes maior, que a  $IC_{50}$  obtida no experimento de concentração-resposta em *T. cruzi*, demonstrando que as concentrações utilizadas neste trabalho não apresentam toxicidade para as células hospedeiras. Foram determinados, índices de seletividade (IS) superiores a 10, indicando que o composto é consideravelmente seletivo e apresenta 14-16 vezes mais toxicidade para o protozoário do que para células de mamífero. Segundo Prayong et al. (2008), quando o composto apresenta IS superior a 3 podemos considerar o composto seletivo para o parasito.

Desta forma nós avaliamos o efeito deste composto na interação parasito/macrófago e verificamos que o composto inibiu 80% a proliferação de amastigotas intracelulares após o tratamento com R72 a 50  $\mu$ M. A análise das culturas de macrófagos infectados por *T. cruzi* por MET revelou que o composto R72 induziu autofagia na célula hospedeira após incubação com os parasitos e o tratamento, pois foi possível evidenciar processos de autofagia caracterizados

pela presença de vacúolo autofágico, figuras de mielina e membranas oriundas do retículo endoplasmático (RE) envolvendo mitocôndria para degradação, indicando um processo de macroautofagia. Além disso, foi possível evidenciar a presença de numerosos corpúsculos lipídicos (CL) e alguns deles em associação com membranas concêntricas indicativa de associação com o vacúolo autofágico. Os CL são inclusões lipídicas livre no citoplasma e são abundantes nas células envolvidas processo de inflamação (MELO et al., 2003).

Existe evidência que o sistema autofágico contribui diretamente para mobilização de lípidios para os CL e destes para o lisossomo. Segundo Singh e Cuervo (2012), a formação de corpúsculos lipídicos é ativada quando ocorrem alterações no metabolismo de lípidios, tais como quando a célula passa por um período prolongado de privação nutricional, o que caracteriza esse processo como seletivo para obtenção de energia.

De acordo com Murphy et al. (2009) os CL interagem com duas organelas: o retículo (membranas) e a mitocôndria. Fato interessante é que foi observada essa interação nos macrófagos infectados após o tratamento com o composto R72 reforçando a ideia que o composto induz a formação de CL em macrófagos infectados com *T. cruzi*.

Melo et al. (2003) observaram aumento significativo do número de CL em macrófagos otidos da cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. cruzi*. Este aumento de CL durante a infecção foi correlacionado com o aumento da geração de leucotrienos e prostaglandina (PGE<sub>2</sub>). Foi observado aumento do número de CL e da produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos peritoneais estimulados com o sonicado da glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010). O grupo de D'Avila et al. (2012) também demonstrou que *T. cruzi* induz a célula hospedeira a produzir CL como um mecanismo de crescimento e sobrevivência envolvendo a produção de prostaglandinas.

Nos macrófagos tratados previamente e infectados com *T. cruzi* verificamos por microscopia eletrônica de varredura que o composto não afetou a adesão, parasito-célula hospedeira, mas inibiu, significativamente, a internalização de tripomastigotas de *T. cruzi*. O modo de ação pelo qual o composto está inibindo a internalização de *T. cruzi* ainda precisa ser investigado,

mas de acordo com o trabalho de LIMA et al. (2011) que demonstra que a fagocitose de *Leishmania amazonensis*, é inibida por indução de autofagia. Como observamos evidências citoquímicas e ultraestruturais da indução de autofagia após o tratamento com o composto R72, pode ser que esse seja, ao menos em parte, o mecanismo de inibição da internalização de *T. cruzi* pelo macrófago. Sendo assim, após o tratamento da célula com o composto derivado de  $\beta$ -lapachona, aparentemente induziu produção de EROs, que afetou a proliferação de amastigotas intracelulares. PARK et al. (2011) demonstraram que a  $\beta$ -Lapachona induz a produção de EROs em células glioma U87 MG e induz a morte celular autofágica.

No presente trabalho ainda não foram identificadas as moléculas envolvidas no processo de autofagia em macrófagos infectados. Entretanto, os resultados obtidos até o momento indicam que o mecanismo não é dependente da produção de óxido nítrico.

O óxido nítrico é um importante agente microbicida produzido pelas células em respostas a diversos agentes patogênicos intracelulares tais como, *Leishmania* spp. (GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1990; MURRAY e NATHAN, 1999) e *Toxoplasma gondii* (ADAMS et al., 1990; SCHARTON-KERSTEN et al., 1997; KHAN et al., 1997) e *T. cruzi* (FREIRE DE LIMA et al., 2000; LOPES e DOS REIS, 2000).

Estudos tem demonstrado que a redução de óxido nítrico está relacionada com a citocina TGF- $\beta$  e IL 10 as quais regulam negativamente a produção de NO e inibem a fagocitose (GUTIERREZ et al., 2009b). Alguns estudos realizados para investigar o efeito do NO sobre a autofagia em células do menisco demonstraram que quando as células são tratadas com um indutor de autofagia (rapamicina), ocorre uma redução significativa da produção de NO (SHEN et al., 2014). Por outro lado, quando as células são tratadas com um inibidor de autofagia (3-MA) ocorre aumento da produção de NO (SHEN et al., 2014). Alternativamente o superóxido gerado pelo derivado pode reagir com o NO, produzindo peroxinitrito (ALVAREZ et al., 2002; PACHER et al., 2007; KIM et al., 2014). A produção de  $O_2^-$  poderia consumir o NO gerado pela célula hospedeira. Os presentes resultados fornecem evidências da inibição da fagocitose e

indução de autofagia por um mecanismo independente da produção de óxido nítrico.

Uma vez que os compostos empregados na terapêutica da doença de Chagas são altamente tóxicos, é relevante observar que um produto natural tem atividade tripanocida superior à do benzonidazol, droga de escolha nesta parasitose, com baixa toxicidade. A continuidade deste estudo poderá levar, em última análise, à formulação de um medicamento, mais eficaz e menos tóxico, melhorando a qualidade de vida de milhões de pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

- O composto derivado de  $\beta$ -lapachona é mais efetivo do que o benzonidazol em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e na proliferação de formas amastigotas de *T. cruzi in vitro*;
- O composto R72 é capaz de induzir intensas alterações na morfologia do protozoário e do macrófago, indicando processos de autofagia;
- A análise por citometria de fluxo indicou que o derivado de  $\beta$ -lapachona induziu morte celular por apoptose e necrose;
- O mecanismo de ação do composto R72 em formas tripomastigotas envolve a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Em macrófagos infectados o mecanismo de ação do composto R72 é independente da produção de óxido nítrico, mas o composto leva a redução detectável de NO.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, L. B.; HIBBS, J. B. JR.; TAINTOR, R. R.; AND J. L. KRAHENBUHL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology.**, v. 144, p. 2725–2729, 1990.

ALVAREZ, M. N.; TRUJILLO, M.; RADÍ, R. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. **Methods in Enzymology.**, v. 359, p. 353–366, 2002.

ALVAREZ, V. E.; KOSSEC, G.; SANT´ANNA, C.; TURK, V.; CAZZULO, J. J.; TURK, B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 283, p. 3454–3464, 2008.

ALVES, M. J.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, v. 21, p. 75–82, 1986.

ANDRADE, A. L.; MARTELLI, C. M.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; AIRES, A. I.; SOUSSUMI, L. M.; COVAS, D. T.; SILVA, L. S.; ANDRADE, J. G.; TRAVASSOS, L. R. ALMEIDA, I. C. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 71, p.594-597, 2004.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology.**, v. 3, p. 819-823. 2005.

ANDRADE, S. G. Characterization of strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from an area around the city of Salvador, state of Bahia (Brazil). *Revista de patologia tropical.*, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; STEINDEL, M.; GUERREIRO, M. L.; MAGALHÃES, J. B.; ALMEIDA, M. C.; REIS, J. N.; SANTOS, V. C.; VALADARES, H. M.; REIS, M. G.; MACEDO, A. M. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v.106, p. 48-56, 2011.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization.**, v. 63, p. 721-726, 1985.

ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHAES, J. B.; FERRIOLLI, F. F.; LUQUETTI A. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 86, p. 624-626, 1992.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD, R. J JR.; HILBERT, S. L.; FERRANS, V. J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 57, p. 328-336, 1997.

ANDRADE, Z. Patologia da doença de Chagas. In: ANDRADE, Z. A.; BRENER, Z.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.** 2<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 246 – 248.

ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Cell Biology.**, v. 5, p. 133-137, 1995.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, F. A. *Trypanosoma cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. **Cell journal.**, v.61, p.1277-1287, 1990.

ANJOS, D. O. **Avaliação dos efeitos de compostos fosforamidatos e de um derivado de  $\beta$ -lapachona na proliferação celular e ultraestrutura de *Trypanosoma cruzi in vitro*.** 64 f. (Disertação de Mestrado) - *Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2009.*

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Agência Sanitária amplia ações em combate a doença de Chagas. Notícias da ANVISA. 25 jun. 2008. Disponível em:<[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/250608\\_1.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/250608_1.htm)>. Acesso em 10 out 2008.

ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E. S, BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 45, p. 819-824, 2000.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; DE SOUZA, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. **Acta Tropica.**, v. 41, p. 17-28, 1984.

ARAÚJO-SANTOS, T.; PRATES DB.; ANDRADE BB.; NASCIMENTO DO.; CLARÊNCIO J.; ENTRINGER PF.; CARNEIRO AB.; SILVA-NETO MA.; MIRANDA JC.; BRODSKYN CI.; BARRAL A.; BOZZA PT.; BORGES, V. M. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases.**, v. 2, p. 873, 2010.

AVILA, J. L.; AVILA, A.; MONZON, H. Differences in allopurinol and 4-aminopyrazol (3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *T. cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, p. 51-60, 1984.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. A.; CANÇADO, J. R.; FERRARI, T. C.; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M.; MOREIRA, M. C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 182, p. 634-638, 2000.

BARBOSA, P. R. B. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, p.132-133, 2006.

BATISTA, D. G.; PACHECO, M. G.; KUMAR, A.; BRANOWSKA, D.; ISMAIL, M. A.; HU, L.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 137, p. 251-259, 2010.

BAUM, S. G.; WITTNER, M.; NADLER, J. P.; HORWITZ, S. B.; DENNIS, J.; SCHIFF, P. B.; TANOWITZ, H. Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 78, p. 4571-4575, 1981.

BIANCO, C.; GRIFFIN, F. M. JR.; SILVERSTEIN, S. C. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 1, p. 1278-1290, 1975.

BIEDERBICK, A.; KERN, H. F.; ELSÄSSER, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. **European Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 3-14, 1995.

BODEY, B.; BODEY, B. J. R.; KAISER, H. E. Apoptosis in the mammalian thymus during normal histogenesis and under various *in vitro* and *in vivo* experimental conditions. **In Vivo**, v. 12, p. 123-133, 1998.

BOVERIS, A.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J. F.; STOPPANI, A. O. M. Effect of  $\beta$ -Lapachone on Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Production in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biochemistry**, v, 175, p. 431-439, 1978.

BRAGA, M. S.; LAURIA-PIRES, L.; ARGANÁRAZ, E. R.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Journal of the Institute of Tropical Medicine**, v. 42, p. 157-161, 2000.

BRENER, Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 149-155, 1984.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COPPENS, I.; RIGDEN, D. J.; GINGER, M. L.; MICHELS, P. A. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 177, p. 83–89, 2011.

BUCKNER, F. S. Sterol 14-Demethylase Inhibitors for *Trypanosoma cruzi* Infections. **Experimental Medicine And Biology**, v. 625, p. 61-80, 2008.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v.4, p. 701-711, 2002.

BURSCH, W. The autophagosomal–lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* v. 8, n.6, p. 569–581, 2001.

CALER, E. V.; CHAKRABARTI, S.; FOWLER, K. T.; RAO, S.; ANDREWS N. W. The Exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 1097-1104, 2001.

CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO, L. C. M.; ANDRADE., S. G. Oral transmission of Chagas' disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Medicina Tropical**, v. 44, p. 97-103, 2002.

CANCADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. Terapêutica. In: BRENER E ANDRADE, Z. (Ed.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, 1979. p. 362–424.

CASTRO, J. A. Contribution of toxicology to the problem of Chagas disease (American trypanosomiasis). **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, p. 271 - 279, 2000.

CASTRO, J. A.; MECA, M. M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chaga's disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471- 479, 2006.

CENTER OF CONTROL DISEASES CONTROL AND PREVENTION. CDC. Biology. 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 6, p. 477-9, 2012.

CHIPPAUX, J. P.; CLAVIJO, A. N.; SANTALLA, J. A.; POSTIGO, J. R.; SCHNEIDER, D.; BRUTUS, L. Antibody drop in newborns congenitally infected

by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. **Tropical Medicine & International Health.**, v. 15, p. 87-93, 2010.

CHO, Y. S. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (Review). **International Journal of Molecular Medicine.**, v. 33, p. 1401-1406, 2014.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; ATAYDE V, D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infection and immunity** v. 71, p. 6184-6191, 2003.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature.**, v. 24, p. S6-7, 2010.

CRESTEIL, T.; JAISWAL, A. K. High levels of expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin. **Biochemical Pharmacology.**, v. 42, p. 1021-1027, 1991.

CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; BOVERIS, A. Drugs inducing generation of free radicals in *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.*, v. 50, p. 598, 1978.

CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, P. C.; BARBOSA, L. G.; MADY, C.; LANNI, B.; ATOLF, N.; FIORELLI, A.; HONORATO, R.; KALLIL, J. New concepts in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 39, p. 59-62, 2006.

CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, P. C.; NOGUEIRA, L. G.; KALIL, J. Autoimmunity. **Advances in Parasitology.**, v. 76, p. 129-152, 2011.

DA ROCHA, D. R.; DE SOUZA, A. M.; DE SOUZA, A. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA V. F. Effect of 9-hydroxy- $\alpha$ - and 7-hydroxy- $\beta$ -pyran Naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi* and Structure-activity Relationship Studies. **Journal of Medicinal Chemistry.**, v.10, p. 564-570, 2013.

DA SILVA, C. F.; BATISTA, M. M.; BATISTA, D. Da. G.; DE SOUZA, E. M.; DA SILVA, P. B.; DE OLIVEIRA, G. M.; MEUSER, A. S.; SHAREEF, A. R.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 52, p. 3307-3314, 2008.

DALIRY, A.; PIRES, M. Q.; SILVA, C. F.; PACHECO, R. S.; MUNDE, M.; STEPHENS, C. E.; KUMAR, A.; ISMAIL, M. A.; LIU, Z.; FARAHAT, A. A.; AKAY, S.; SOM, P.; HU, Q.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.; DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. The trypanocidal activity of amidine compounds does not correlate with their binding affinity to *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 55, p. 4765-4773, 2011.

DANTAS, A. P.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of submicroscopic cytology and pathology.**, v. 35, p. 287–294, 2003.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A.; MELO, R. C. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. **Mediators of Inflammation.**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

DE CASTRO, S.L.; BATISTA, D. G.; BATISTA, M.M.; BATISTA, W.; DALIRY, A.; DE SOUZA, E. M.; MENNA-BARRETO, R. F.; OLIVEIRA, G. M.; SALOMÃO, K.; SILVA, C. F.; SILVA, P. B.; SOEIRO, M. N. C. Experimental chemotherapy for Chagas disease: a morphological, biochemical, and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and naphthoquinones. **Molecular Biology International.**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

DE MOURA, K. C. G.; EMERYA, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C.F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society.**, v.12, p. 325-338, 2001.

DE MOURA, K. C. G.; SALOMÃO, K.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; EMERYA, F. S.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran [*b*-4,3] naphthol [1,2-*d*] imidazoles from lapachone. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 39, p. 639-645, 2004.

DE SOUZA, E. M.; DA SILVA, P. B.; NEFERTITI, A. S.; ISMAIL, M. A.; ARAFA, R. K.; TAO, B.; NIXON-SMITH, C. K.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology.**, v. 127, p. 429-235, 2011.

DE SOUZA, E. M.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; WILSON, W. D.; HU, Q.; BOYKIN, D. W.; BATISTA, M. M.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; SOEIRO, M. N. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Biochemical Pharmacology.**, v.15, p. 593-600, 2004 .

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design.**, v. 8, p. 269 – 285, 2002.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 313-25, 2008.

DE SOUZA, W. O Parasito e sua Interação com o Hospedeiro. In. BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas**. 2ª ed. Editora – Guanabara Koogan. , cap. 3, p. 21- 40, 2000.

DE SOUZA, W.; DELI, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Cell Biology International.**, v. 2010, p. 1-18, 2010.

DENNINGER, V.; KOOPMANN, R.; MUHAMMAD, K.; BARTH, T.; BASSARAK, B.; SCHÖNFELD, C.; KILUNGA, B. K.; DUSZENKO. Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? **Methods in Enzymology.**, v. 451, p.373-408, 2008.

DI ROSSO, M. E.; BARREIRO, A. M. L.; ELINGOLD, I.; STERLE, H.; BAPTISTA, F. S.; FERREIRA, V. F.; GALLEANO, M.; CREMASCHI, G.; DUBIN, M. Novel o-naphthoquinones induce apoptosis of EL-4 T lymphoma cells through the increase of reactive oxygen species. **Toxicol In Vitro.**, v. 27, v. 7, p. 2094-104, 2013.

DIAS, J. C. P. Control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Brasil. **Medicina**, Buenos Aires, v. 55, p. 7-9, 1997.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública.**, v. 23, p. 13 - 22, 2007.

DIAS, J. C. P. História natural da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**; v. 29, p. 47-66, 2000.

DIAS, J. C. The treatment of Chagas disease (South American Trypanosomiasis). **Annals of Internal Medicine.**, v. 144, p. 772-774, 2006.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas, Clínica e Terapêutica. In: **Controle da doença de Chagas**. Um manual prático par o clínico geral. Brasília: Ministério da Saúde, Sucam, 1990. 56 p.

DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 95, p. 611- 613, 2000.

DINIZ, L. DE. F.; URBINA, J. A.; DE ANDRADE, I. M.; MAZZETI, A. L.; MARTINS, T. A.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M.T. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases.**, v. 7, p. 1-8, 2013.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R. P.; ESQUIVEL, D. M. beta-Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochem Pharmacol.**, v. 28, p. 723–728, 1979.

DOCAMPO, R.; LOPES, J. N.; CRUZ, F. S.; SOUZA, W. Trypanosoma cruzi: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. **Experimental Parasitology.**,v. 42, p. 142-149, 1977.

DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E.; ANDMORENO, S. N. Intracellular  $Ca_2^+$  storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal.**, v. 310, p. 1005–1012, 1995.

DUBIN, M.; FERNANDEZ VILLAMIL, S. H.; STOPPANI, A. O. Cytotoxicity of beta-lapachone, an naphthoquinone with possible therapeutic use. **Medicina (B AIRES)**, v. 61, p. 343-350, 2001.

DUSZENKO, M.; GINGER, M. L.; BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COLOMBO, M. I.; COOMBS, G. H.; COPPENS, I.; JAYABALASINGHAM, B.; LANGSLEY, G.; DE CASTRO, S. L.; MENNA-BARRETO, R.; MOTTRAM, J. C.; NAVARRO, M.; RIGDEN, D. J.; ROMANO, P. S.; STOKA, V.; TURK, B.; MICHELS, P. A. Autophagy in protists. **Autophagy**, v. 7, p. 127–158, 2011.

FAVORETO, J. R. S.; DORTA, M. L.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* 175 kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. **Experimental Parasitology**, v. 89, p.188-194, 1998.

FERNANDES, M. C.; DA SILVA JR, E. N.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L MENNA-BARRETO, R. F. S. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 139, p. 26–36, 2012.

FERRARI, M. D. **Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida dos derivados hidroalcoólicos brutos da casca, folha e flores de *Tabebuia avellanedae* (ipê roxo)**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Saúde) - Universidade de Franca, (Franca).

FERREIRA, H. O. Tratamento da forma indeterminada da doença de chagas com nifurtimox e benzonidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, p. 209-211, 1990.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F.  $\beta$ -lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 1-21, 2010.

FERRERO-GARCÍA, M. A.; TROMBETTA, S. E.; SÁNCHEZ, D. O.; REGLERO, A.; FRASCH, A. C.; PARODI, A. J. The action of *Trypanosoma cruzi* transsialidase on glycolipids and glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 213, p. 765–771,1993.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. **Traffic**, v. 5, p. 905-913, 2004.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 55-59, 1987.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, p. 199–203, 2000.

GARRIDO, V. V.; DULGERIAN, L. R.; STEMPIN, C. C.; CERBÁN, F. M. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and

trypanosoma cruzi survival in macrophages. **International Journal of Biological Sciences.**, v. 7, p. 1257-1272, 2011.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S. S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, v. 65, p. 85–94, 1994.

GIORGI, M. E.; DE LEDERKREMER, R. M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydrate Research.**, v. 6, p. 1389-1393, 2011.

GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. Effects of  $\beta$ -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v. 240, p. 273-280, 1985.

GÓMEZ CASTELLANOS, J.; RUBÉN PRIETO, JOSÉ M.; HEINRICH, MICHAEL "Red Lapacho —A global ethnopharmacological commodity?". **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 121, p. 1–13, 2009.

GONÇALVES de ARAÚJO, J. A.; SABROZA, C. P.; DA SILVA, F. R. F. L. Situação atual Disponível em <http://www.fiocruz.br/Chagas/cgi/cgilua.exe/sys/star.htm?sid=131>: Acesso em 12 nov. 2007.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B. JR.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an Larginine-dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology.**, v.144, p. 278–283, 1990.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry.** v. 271,p. 1638–1650, 2004.

GUTIERREZ, F. R.; GUEDES, P. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology.**, v. 31, p. 673–685, 2009a.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 104, p. 236-245, 2009b.

HERMAN, M.; GILLIES, S.; MICHELS, P. A.; RIGDEN, D. J. Autophagy and related processes in trypanosomatids: Insights from genomic and bioinformatic analyses. **Autophagy.**, v. 2, p. 107-118, 2006.

HERNÁNDEZ, S. M.; SANCHEZ, M. S.; TARLOVSKY, M. N. S. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica.**, v. 98, p. 94-102, 2006.

HIBBS, J. B JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z, RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 30, p. 87-94, 1988.

HUBER, G. H.; POLLEY, M. J.; LINSOTT, W. D.; FUDENBERG, H. H.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and immunoglobulin. **Science.**, v 13, p. 1281-1283, 1968.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 94, p. 13955–13960, 1997.

KIM, S, SIEGLER, M. A.; KARLIN, K. D. Peroxynitrite chemistry derived from nitric oxide reaction with a Cu(II)-OOH species and a copper mediated NO reductive coupling reaction. **Chemical communications (Cambridge).**, v. 18, p. 2844-2846, 2014.

KLIONSKY, D. J. What can we learn from trypanosomes? **Autophagy.**, v. 2, p. 63-64, 2006.

KLIONSKY, D. J.; OHSUMI, Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. **Annual Review of Cell and Developmental Biology.**, v. 15, p. 1-32, 1999.

LAMBERTI, M. J.; VITTAR, N. B.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; RIVAROLA V. A. Synergistic enhancement of antitumor effect of  $\beta$ -Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). **Phytomedicine.**, v. 15, 1007-1012, 2013.

LANA, M. D.; LOPES, L. A.; MARTINS, H. R.; BAHIA, M. T.; MACHADO-DE-ASSIS, G. F.; WENDLING, A. P.; MARTINS-FILHO, O. A.; MONTOYA, R. A.; DIAS, J. C.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; COURA, J. R. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 104, p. 1139-1147, 2009.

LANNI, B. M; MADY, C. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. É eficaz o tratamento etiológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.**, v. 70, p. 59-61, 1998.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M. S.; VEXENAT, A. C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D. L.; TEIXEIRA, A. R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 63, p. 111-118, 2000.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry.**, v. 11, p. 2060–2071, 2011.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental Cell.**, v. 6, p. 463-477, 2004.

LI, C. J.; LI, Y. Z, PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by  $\beta$ -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v.9, p. 13369-13374,1999.

LI, Y.; SUN, X.; LAMONT, J. T.; PARDEE, B. A.; LI, C. J. Selective killing of cancer cells by  $\beta$ -lapachone. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 100, p. 2674-2678, 2003.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S. PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology.**, v. 144, p. 4794–4797, 1990.

LIMA, J. G.; DE FREITAS, V. C.; GOMES, I. N.; AZEVEDO, C. M.; DOS SANTOS, R. R.; VANNIER-SANTOS, M. A.; VERAS, P. S. Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 25, p. 604-609, 2011.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MACHADO, M. P. SILVA.; PINTO, G. P. Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do lapachol. Separata dos **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco.**, v.14, p.129 – 135, 1956.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry.**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOPES, J. N.; CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; VASCONCELLOS, M. E.; SAMPAIO M. C.; PINTO, A. V.; GILBERT, B. In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.**, v. 72, p.523-531, 1978.

LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. **Apoptosis.**, v. 5, p. 221–224, 2000.

IYOSHIDA, N.; BLANCO, S. A; ARAGUTH, M. F.; RUSSO, M.; GONZALEZ, J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigote of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, v. 39, p. 39, 1990.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in Immunology.**, v.3, p. 361-367, 2012.

MAGANTO-GARCIA, E.; PUNZON, C.; TERHORST, C.; FRESNO, M. Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. **Traffic.**, v. 9, p. 1299-1315, 2008.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 276, n. 22, p. 19382–19389, 2001.

MARICONI, F. A. M. **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, 1999.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart Disease. **Journal of the American Heart Association.** v. 115, p. 1109-1123, 2007.

MEIRELLES, M. N.; CHIARI, E.; DE SOUZA, W. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. **Acta Tropica.**, v. 39, p. 195-203, 1982.

MEJIA, A. M.; HALL, B. S.; TAYLOR, M. C.; GÓMEZ-PALACIO., A.; WILKINSON, S. R.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; KELLY, J. M. Benzimidazole resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 206, p. 220-228, 2012.

MELO, R. C.; D'AVILA, H.; FABRINO, D. L.; ALMEIDA, P. E.; BOZZA, P.T. Macrophage lipid 9 body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue & Cell.**, v.35, p. 59-67, 2003.

MENEZES, D.; VALENTIM, C.; OLIVEIRA.; VANNIER-SANTOS, M. A. Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research.**, v. 98, p. 99-105, 2006.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CORRÊA, J. R.; PINTO, A. V.; SOARES, M. J.; CASTRO, S. L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from  $\beta$ -lapachone. **Parasitology Research.**, v. 101, p. 895–905, 2007.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A. V.; MORGADO-DIAZ, J. A.; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S. L. Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 56, p. 1034–1041, 2005.

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

MENNA-BARRETO, R. F.; CORRÊA, J. R.; CASCABULHO, C. M.; FERNANDES, M. C, PINTO, A. V.; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S. L. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology.**, v. 136, p. 499-510, 2009a.

MENNA-BARRETO, R. F.; GONCALVES, R. L.; COSTA, E. M.; SILVA, R. S.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; DE CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine.*, v. 1, p. 644-53, 2009.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - Departamento de Vigilância Epidemiológica Esplanada dos Ministérios. Nota Técnica. **Doença de Chagas Aguda por transmissão oral**. Brasília-DF, 2007. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_chagas2308.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf)>. Acesso em 08 out. 2008.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine.**, v. 1, p. 1-2, 2014.

MOLINA, J.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; URBINA, J. A. In vivo activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 46, p. 137-140, 2000.

MOLINA, J.; URBINA, J.; GREF, R.; BRENER, Z.; RODRIGUES JÚNIOR, J. M. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole D0870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres.. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 47, p. 101-104, 2001.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes Interact with different structures on the surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology.**, v. 73, p. 1-14, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.**, v. 16, p. 55-63, 1983.

MURPHY, S.; MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 179, p. 441-447, 2009.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani* . **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 189, p. 741-746, 1999.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T., ANDYOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathway sin *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **International Journal for Parasitology.**, v. 32, p. 405-414, 2002.

NETO, A. V. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.**, v. 70, p. 63-64, 1999.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 15, p. 653-655, 2009.

NOGUEIRA, N. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Ciba Foundation Symposium.**, v. 99, p. 52–73, 1983.

NOGUEIRA, N.; CONH, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 143, p. 1402–1420, 1976.

OMS. World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 2002. **Technical Report Series.**, v. 905.

OMS. World Health Organization. **Chagas disease.** OMS, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>>. Acesso em 16 set. 2007.

OMS. World Health Organization. **Chagas disease.** OMS, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em maio de 2014

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, v. 19, p. 201–21, 1986.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews.**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PARDEE, A. B.; LI, Y. Z.; LI, C. J. Cancer therapy with beta-lapachone. **Current Cancer Drug Targets.**, v. 2, p. 227–242, 2002.

PARK, E. J.; CHOI, K. S.; KWON, T. K.  $\beta$ -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. **Chemico-Biological Interactions.**, v. 15, p. 37-44, 2011.

PARK, E. J.; MIN, K. J.; LEE, T. J.; YOO, Y. H.; KIM, Y. S.; KWON, T. K.  $\beta$ -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. **Cell Death & Disease.**, v. 15, p. 1-10, 2014.

PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 275, p. 5416–5424, 2000.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review., **Molecules.**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.

PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GILBERT, B.; PELEGRINO, J.; MELLO, R. T. *Schistosomiasis mansoni*: blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: i. naphthoquinones and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 71, p.133-135,1977.

PINTO, A. Y.; VALENTE, V.D. A C.; COURA, J. R.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; SANTOS, L. C.; FERREIRA, A. G. JR.; DE MACEDO, R. C. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. **PLoS One.**, v. 27, p. 64450, 2013.

PINTO, C. N.; DANTAS, A. P.; DE MOURA, K. C.; EMERY, F. S.; POLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M. C.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. **Arzneimittel Forschung - Drug Research.**, v. 50, p.1120-1128, 2000.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases.**, v. 1, p. 92-100, 2001.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia.**, v. 79, p. 598-601, 2008.

PREVIATO, J. O.; JONES, C.; GONÇALVES, L. P.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L. R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. O-glycosidically linke Nacetylglucosaminebound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma*. **Biochemical Journal.**, v. 1, p. 151-9, 1994.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. D. E. C.; ARAYA, J. E.; DA SILVEIRA, J. F.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell. **Infection and Immunity.**, v. 61, p. 3636-3641, 1993.

RASSI, A.; RASSI Junior A.; RASSI, GG. Fase aguda. In: ANDRADE, Z. A.; BRENER, Z.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryotic Cell.**, v. 1, p. 11–21, 2002.

REZ, G.; PALFIA, Z.; FELLINGER, E. Occurrence and inhibition by cycloheximide of apoptosis in vinblastine-treated murine pancreas. A role for autophagy. **Acta Biologica Hungarica.**, v. 42, p.133-140, 1991.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: ANDRADE, Z. A.; BRENER, Z.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 379 – 388, 2000.

RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M., ROCHA, M. O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology.**, v. 9, p. 576-589, 2012.

RIBEIRO-JÚNIOR, G. **A ocorrência de triatomíneos (hemiptera: reduviidae) em residências próximas a remanescentes florestais de Salvador e caracterização das cepas de *Trypanosoma cruzi* (chagas, 1909) isoladas.** Monografia, 2006. 54 p.

RODRIGUES, J. C.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. **Current Pharmaceutical Design.**, v. 14, p. 925-938, 2008.

RODRIGUES, J. C.; SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. **Brazilian Journal of morphological Sciences.**, v. 23, p. 87-98, 2006.

ROSS, D.; KEPA, J. K.; WINSKI, S. L.; BEALL, H. D.; ANWAR, A.; SIEGEL, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico Biological Interactions.**, v. 129, p. 77-97, 2000.

RUSSOMANDO, G.; DE TOMASSONE, M. M.; DE GUILLEN, I.; ACOSTA, N.; VERA, N.; ALMIRON, M.; CANDIA, N.; CALCENA, M. F.; FIGUEREDO, A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 59, p. 487-491, 1998.

SACAU, P. E.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T, et al. Efeitos inibitórios de derivados de lapachol em Epstein-Barr ativação do vírus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.**, v. 11, p. 483-488, 2003.

SALOMÃO, K.; SANTANA, N.; MOLINA, M. T.; CASTRO, S. L.; MENNA-BARRETO, R. F. S. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC Microbiology.**, v. 13, p. 196, 2013.

SAMUILOV, V. D.; OLESKIN, A. V.; LAGUNOVA, E. M. Programmed cell death. **Biochemistry.**, v. 65, p.873-887, 2000.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A.; DE ABREU, F. C.; CHIARI, E.; GOULART, M. O.; SANT'ANA, A. E. Mollicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Planta Medica.**, v. 67, p. 92-93, 2001.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine.**, v.185, p. 1261-1273, 1997.

SCHAUMBURG, F.; HIPPE, D.; VUTOVA, P.; LUDER, C. G. K. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. **Journal of Parasitology.**, v. 69, p. S69-S85, 2006.

SCHENKMAN, S.; ANDREWS, N. W.; NUSSENZWEIG, V.; ROBBINS, E. S. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell.**, v. 7, p.157-65, 1988.

SCHERZ-SHOVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends in Cell Biology.**, v. 17, p. 422-427, 2007.

SCHERZ-SHOVAL, R.; SHVETS, E.; FASS, E.; SHORER, H.; GILL, L.; ELAZAR, Z. Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically the activity of Atg4. **Journal Embo.**, v. 26, p. 1749-1760, 2007.

SCHIJMAN, A. G.; ALTCHER, J.; BURGOS, J. M.; BIANCARDI, M.; BISIO, M.; LEVIN, M. J.; FREILIJ, H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 52, p. 441-449, 2003.

SCHOR, N. A.; MORRIS, H. P. The activity of the D-T diaphorase in experimental hepatomas. **Cancer Biochemistry biophysics.**, v. 2, p. 5–9, 1977.

SCHWARCZ, T. M. N.; HERNÁNDEZ, S. M.; BEDOYA, A. M.; LAMMEL, E. M.; ISOLA, E. D. Polyamines in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry and molecular Biology international.**, v. 30, p. 547–558, 1993.

SEN, S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.**, v. 67, p. 287-319, 1992.

SHEN, C.; YAN, J.; ERKOCAK, O. F.; ZHENG, X. F.; CHEN, X. D. Nitric oxide inhibits autophagy via suppression of JNK in meniscal cells. **Rheumatology.**, v. 53, p. 1022-1033, 2014.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; LOPES, M. H.; TOLEZANO, J. E.; UMEZAWA, E.; AMATO, N, V.; BARRETO, A. C.; HIGAKI, Y.; MOREIRA, A. A.; FUNAYAMA, G.; BARONE, A. A, et al. Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center **Revista do Instituto de Medicina Tropical.**, v. 32, p. 16-27, 1990.

SIEGEL, D.; ROSS, D. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 29, p. 246–253, 2000.

SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. **Biochemical Pharmacology.**, v. 83, p. 1033–1040, 2012.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Quimica Nova.**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVA, T.M.S.; CAMARA C.A.; BARBOSA, T. P.; SOARES, A. Z.; DA CUNHA, L. C.; PINTO, A, C.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry.**, v. 13, p. 193-196, 2005.

SILVEIRA, A. C. Profilaxia. In Z Brener, ZA Andrade, M Barral Neto (eds.), ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 75-87, 2000.

SINGH, R.; CUERVO, A. M. Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism. ***International Journal of Cell Biology.***, v. 2012, p.1-12, 2012.

SLANE, B. G.; AYKIN-BURNS, N.; SMITH, B. J.; KALEN, A. L, GOSWAMI, P. C.; DOMANN, F. E.; SPITZ, D. R. Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidative stress, and genomic instability. ***Cancer Research.***,v. 66, p. 7615–7620, 2006.

SOEIRO, M. N.; DE SOUZA, E. M.; DA SILVA, C. F.; BATISTA, D. D. A .G.; BATISTA, M. M.; PAVÃO, B. P.; ARAÚJO, J. S.; AIUB, C. A.; DA SILVA, P. B.; LIONEL, J.; BRITTO, C.; KIM, K.; SULIKOWSKI, G.; HARGROVE, T. Y.; WATERMAN, M. R.; LEPESHEVA, G. I. *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*** v. 57, p. 4151-4163, 2013a.

SOEIRO, M. N.; WERBOVETZ, K.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.; WANG, M. Z.; HEMPHILL, A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. ***Parasitology.***, v. 140, p. 929-951, 2013b.

SOSA-ESTANI, S. .; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B. M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. ***The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.***, v.59, p. 526-9,1998.

STEINDEL, M.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. ***Ciência Hoje,*** v.37, p. 32-37, 2005.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN. R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. ***Acta Histochemica.***, v. 114, p. 785-96, 2012.

STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. ***Academia Nacional de Medicina.***, v. 59, p. 147- 165, 1999.

STRASSBURG, A.; STRASSBURG, C. P.; MANNS, M. P.; TUKEY, R. H. Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue. ***Molecular Pharmacology.***, v. 61, p. 320–325, 2002.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J. A.; HEUSER, J. E.; ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosoma* invasion of mammalian cells., ***Cell*** v. 71, p. 1117– 1130, 1992.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA JR, J. R. C.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of 2-hydroxyl- 3 (3-methyl- 2- butenyl)- 1,4 naphthoquinones (Lapachol). **Phytotherapy Research.**, v. 15, p. 44-48, 2001.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v.1, p. 472-81, 2001.

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

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 104, p. 311-318, 2009.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A. J. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 21, p. 27-38, 2003b.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; ZIGMAN, B.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains., **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 21, p. 39-48, 2003a.

VANNIER-SANTOS M. A.; LINS, U. Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa. **Biological Procedures.**, v. 3, p. 8-18, 2001.

VANNIER-SANTOS MA1, MARTINY A, DE SOUZA W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design.**, v. 8, p. 297-318, 2002.

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron Microscopy in Antiparasitic Chemotherapy: A (Close) View to a Kill. **Current Drug Targets.**, v. 10, p. 246-260, 2009.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MENEZES D.; OLIVEIRA, M. F.; DE MELLO, F. G. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. **Microbiology.**, v. 154, p. 3104-3111, 2008.

VANNIER-SANTOS, M. A.; PIMENTA, P. F.; DE SOUZA, W. Effects of phorbol ester on *Leishmania mexicana amazonensis*: an ultrastructural and cytochemical study. **Journal of submicroscopic cytology and pathology.**, v. 20, p. 583-593, 1988.

VÁZQUEZ, A.; RUIZ-ROSADO, JDE, D.; TERRAZAS, LI.; JUÁREZ, I.; GOMEZ-GARCIA, L.; CALLEJA, E.; CAMACHO, G.; CHÁVEZ, A.; ROMERO, M.; RODRIGUEZ, T.; ESPINOZA, B.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Mouse macrophage galactose-type lectin (mMGL) is critical for host resistance against

*Trypanosoma cruzi* infection. **International Journal of Biological Sciences.**, v. 23, p. 909-920, 2014.

VEIGA-SANTOS, P.; BARRIAS, E. S.; SANTOS, J. F.; DE BARROS MOREIRA T. L.; DE CARVALHO T. M.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, v. 40, p. 61-71, 2012.

VINHAES, C. M.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública.**, v. 16, p. 7-12, 2000.

VIOTTI, R.; ALARCÓN, DE NOYA, B.; ARAUJO-JORGE, T.; GRIJALVA, M. J.; GUHL, F.; LÓPEZ, M. C.; RAMSEY, J. M.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G.; SOSA-ESTANI, S.; TORRICO, F.; GASCON, J. Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 58, p. 635-639, 2014 .

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected evidence by evidence-base medicine. **Expert Review of Anti-infective Therapy.**, v. 5, p. 717–726, 2007.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal.**, v. 127, p. 151-62, 1994.

WERNER, A. P. T.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; GITTITH, S. A.; ZULANTAY, N.Y.; CORTÉS, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p. 133–138, 1998.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Flow Cytometry-Based Apoptosis Detection. **Methods Molecular Biology.**, v. 552, p. 19-32, 2009.

WOOLSEY, A. M.; BURLEIGH, B. A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cell Microbiology.**, v. 6, p. 829–838, 2004.

XIE, ZHIPING.; KLIONSKY, D. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology.**, v. 9, p. 1102-1109, 2007.

YORIMITSU, T.; NAIR, U.; YANG, Z.; Klionsky, D. J Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 281, p. 30299–30304, 2006.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.**, v.78, p. 87-111, 2006.

YOSHIDA, N.; BLANCO, S.A.; ARAGUTH, M.F.; RUSSO, M.; GONZALEZ, J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of

*Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, v. 39, p. 39–46, 1990.

ZHANG, S.; LI, Y.; HE, X.; DONG, S.; HUANG, Y.; LI, X.; LI, Y.; JIN, C.; ZHANG, Y.; WANG, Y. Photothermolysis mediated by gold nanorods modified with EGFR monoclonal antibody induces Hep-2 cells apoptosis in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine.**, v. 17, p. 1931-1946, 2014.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 107, p. 1051-1054, 2009.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate Review. **Genes & Development.**, v. 1, p. 1-15, 2006.