

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

JANA MESSIAS SANDES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ADUTOS DERIVADOS DA
REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Trypanosoma cruzi*:
UMA ABORDAGEM MOLECULAR, CITOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL

RECIFE

2012

Jana Messias Sandes

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ADUTOS DERIVADOS DA
REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Trypanosoma cruzi*:
UMA ABORDAGEM MOLECULAR, CITOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo

Co- Orientador: Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva

Recife,

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S215a Sandes, Jana Messias.

Avaliação da atividade biológica de adutos derivados da reação morita-baylis-hillman sobre *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem molecular, citoquímica e ultraestrutural/ Jana Messias Sandes. Recife: J. M. Sandes, 2012.

82 p.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo, co-orientador: Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Quimioterapia. 3. Biologia Celular. 4. Morte celular. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz. II. Silva, Carlos Gustavo Regis da. III. Título.

CDU 616.937

JANA MESSIAS SANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ADUTOS DERIVADOS DA
REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Trypanosoma cruzi*:
UMA ABORDAGEM MOLECULAR, CITOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 28/02/2012

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo (Orientadora)
Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira (Revisora/ Titular Interna)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura (Titular Externa)
Departamento de Genética- UFPE

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Regina, pela paciência, vontade, perseverança e por ter acreditado em mim, no meu trabalho, e que seria possível o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao meu co-orientador Carlos, por ter me iniciado com tanto zelo ao mundo novo da biologia molecular e por ter passado pacientemente um pouco dos seus conhecimentos para mim.

Ao meu esposo Marcos, por ter sido minha base, por ter me sustentado e me colocado para cima nos momentos mais difíceis da minha vida. Sem você eu não teria conseguido chegar aonde cheguei nem terminar mais essa etapa da minha vida!

Aos meus pais, Kátia e Paulo, pelo apoio de sempre, pelo amor incondicional, por estarem presentes em todas as minhas decisões e por aceitarem as minhas escolhas.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por ter disponibilizado a infraestrutura e os insumos para a realização deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, Amanda, Taci, Divar, Andrezza, Aline, Juliana, Karla, Keicy e Neyla, pela companhia, pelos bons e maus momentos, pelos desafios enfrentados, pela união, pelas risadas fora de hora, e pela torcida em todas as minhas conquistas.

Aos amigos e colegas do Aggeu, em especial a Nina e Rafael, pela ajuda com a aquisição e análise dos dados do citômetro e pela paciência ao explicar cada detalhe dessa até então desconhecida ferramenta. E à Maria, pela companhia e ajuda nos meus dias de experiência com a biologia molecular.

Aos meus amigos de faculdade, agradeço muito a Deus por ter vocês em minha vida, pelos momentos de diversão, de discussão, e de tantas conversas agradáveis e construtivas.

Aos amigos do IESF, que me ajudaram a conseguir o equilíbrio necessário para seguir minha vida, e o mestrado, adiante. Sou grata por cada conselho, cada gesto de carinho, e por me fazer realizada ao poder contribuir com as pessoas que lá chegam buscando ajuda e atenção.

Aos meus amigos distantes, que sempre torcem pelo meu crescimento e mesmo de longe vibram com cada conquista minha!

A todos que participaram direta ou indiretamente da construção desse trabalho, que com muito esforço e dedicação consegui desenvolver, muito obrigada!

“O aprendizado deve ser sempre o objetivo principal de qualquer pesquisa. Os resultados podem não ser exatamente os esperados, mas a experiência e os conhecimentos adquiridos são para toda a vida!”

Jana M. Sandes

SANDES, Jana Messias. **Avaliação da Atividade Biológica de Adutos Derivados da Reação Morita-Baylis-Hillman sobre *Trypanosoma cruzi***: uma abordagem molecular, citotóxica e ultraestrutural. 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é um importante problema de saúde pública na América Latina, com cerca de 7,6 milhões de pessoas infectadas. O benznidazol e o nifurtimox são os únicos fármacos disponíveis para o tratamento, e além de apresentarem sérios efeitos colaterais, a sua eficácia na fase crônica da doença ainda é controversa. Neste sentido, nós sintetizamos o aduto Morita-Baylis-Hillman 3-hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenilpropanonitrilo) (MBHA 3) e avaliamos sua atividade biológica sobre o *T. cruzi*. O MBHA 3 inibiu fortemente o crescimento das formas epimastigotas, com $IC_{50} / 72h$ de 28,5 μM e causou intensa lise de tripomastigotas, com $IC_{50} / 24h$ de 25,5 μM . A análise ultraestrutural mostrou alterações morfológicas significantes, como arredondamento do corpo celular e desorganização intracelular. Alterações indicativas de apoptose, autofagia ou necrose também foram observadas nas células mais afetadas. A fim de melhor compreender o mecanismo envolvido na morte celular induzida pelo composto, nós utilizamos a microscopia confocal e a citometria de fluxo aliadas a sondas fluorescentes, como anexina-V (AV)/ iodeto de propídio (IP); Calceína-AM (CA)/ homodímero de etídio (HE); laranja de acridina (LA) e rodamina 123. O tratamento com 6 e 12 $\mu g / mL$ revelou uma alta porcentagem de células viáveis pela CA/ HE, mas também induziu alterações mitocondriais e aumento da marcação com a LA, sugerindo que um processo de morte celular programada (MCP) por autofagia poderia estar ocorrendo. Por outro lado, o tratamento com 24 $\mu g / mL$ levou à perda de viabilidade celular com danos excessivos sobre a membrana plasmática e mitocondrial e fragmentação inespecífica do DNA. Em conclusão, nossos achados sugerem que o MBHA 3, em alta concentração, induz MCP por necrose em *T. cruzi*.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*, Quimioterapia, Biologia Celular, Morte celular.

SANDES, Jana Messias. **Biological Activity Evaluation of Morita-Baylis-Hillman adducts against *Trypanosoma cruzi***: a molecular, cytochemical and ultrastructural approach. 2012. Dissertation (Academic Master in Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a major public health concern in Latin America, with about 7.6 million people infected. The benznidazole and nifurtimox are the only available drugs for treatment, and besides presenting serious side effects their efficacy in chronic phase of disease is still controversial. In this sense, we have synthesized the Morita–Baylis–Hillman adduct 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile) (MBHA 3) and evaluated its biological activity on *T. cruzi*. MBHA 3 strongly inhibited epimastigote growth, with $IC_{50}/72\text{ h}$ of 28.5 μM and also caused intense trypomastigotes lysis, with an $IC_{50}/24\text{ h}$ of 25.5 μM . Ultrastructural analysis showed significant morphological changes on both treated parasite forms, such as rounding of cell body and intracellular disorganization. Morphological changes indicative of apoptosis, autophagy or necrosis were also observed in most affected cells. In order to better understand the mechanism involved in drug-induced cell death, we used confocal microscopy and flow cytometry allied to fluorescent probes such as Annexin-V (AV)/ Propidium Iodide (PI); Calcein-AM (CA)/ ethidium homodimer (EH); Acridine orange (AO) and Rhodamine 123. The MBHA 3 treatment at 6 and 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed a high percentage of viable cells by CA/EH assay, but also induced mitochondrion alterations and increase of AO labeling, suggesting that an autophagic process of programmed cell death (PCD) could be occurring. On the other hand, at 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the compound led to loss of cell viability with an extensive damage on plasma and mitochondrion membrane and nonspecific DNA fragmentation. In conclusion, our finds suggested that MBHA 3, at higher concentration, induces *T. cruzi* PCD by necrosis.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chemotherapy, Cellular Biology, Cell Death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição vetorial dos três principais vetores domésticos da doença de Chagas	13
Figura 2-	Fluxo de migração a partir da América Latina para os países não endêmicos, com estimativa do número total de indivíduos infectados	14
Figura 3-	Achados clínicos da doença de Chagas	16
Figura 4-	As formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 5-	Transmissão vetorial e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 6-	Representação da estrutura interna da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 7-	A reação de Baylis-Hillman	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	<i>Acridine orange</i>
AV	Anexina-V
AVO	<i>Acidic Vesicular Organelles</i> (Organelas vesiculares acídicas)
BNZ	Benznidazol
CA	Calceína-AM
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (Microscópio Confocal de Varredura a Laser)
DABCO	1,4-diazobicíclico[2.2.2.]octano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i> (Contraste de Interferência Diferencial)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EH	<i>Ethidium Homodimer</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
GER	Grupo elétron-retirador
GTP	Guanosina Trifosfato
HE	Homodímero de Etídio
IC ₅₀	Inibição do crescimento de 50% de formas epimastigotas
IL ₅₀	Indução de lise de 50% das formas tripomastigotas
IP	Iodeto de Propídio
IV	Índice de Variação
LA	Laranja de Acridina
LIT	Infusão de fígado e triptose
MBHA	<i>Morita-Baylis-Hillman Adducts</i> (Adutos derivados da reação Morita-Baylis-Hillman)
MBHA 3	3-hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenilpropanonitrilo)
MBHR	<i>Morita-Baylis-Hillman Reaction</i> (Reação Morita-Baylis-Hillman)
MCP	Morte Celular Programada
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
PARP - 1	Poli (ADP-ribose) polimerase 1
PCD	<i>Programmed cell death</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
PI	<i>Propidium Iodide</i>
Rh 123	Rodamina 123
TcFPPS	Farnesil difosfato sintase de <i>T. cruzi</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	A doença de Chagas	11
1.1.1	A Patologia da doença de Chagas	14
1.1.2	O Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.1.3	A Biologia Celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.1.3.1	<i>O cinetoplasto e a mitocôndria</i>	21
1.1.3.2	<i>Os reservossomos</i>	21
1.1.3.3	<i>Os acidocalcisomos</i>	22
1.1.3.4	<i>Os glicossomos</i>	22
1.1.3.5	<i>Os microtúbulos sub-peliculares</i>	22
1.1.4	A Quimioterapia da doença de Chagas	23
1.2	Adutos derivados da Reação Morita-Baylis-Hillman	26
1.3	Morte Celular Programada	27
2	PERGUNTA CONDUTORA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4	ARTIGOS	32
4.1	Artigo 1: 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): a new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
4.2	Artigo 2: Cell death induced by 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile) in <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A - Certificado do CEUA/ CPqAM	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), é um sério problema de saúde pública, com cerca de 7,6 milhões de pessoas infectadas na região que se estende do México até a Argentina e o Chile, com cerca de 11.000 mortes em 2008. Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 1,9 milhões de infectados, causando prejuízo na economia e na qualidade de vida das populações afetadas. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007, 2010).

A principal forma de transmissão da doença de Chagas aos seres humanos e para mais de 150 espécies de animais domésticos (cães e gatos, por exemplo) e mamíferos selvagens (roedores, marsupiais e tatus), é através de insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, dentro de três ciclos que se sobrepõem: doméstico, peridoméstico e silvestre (CLAYTON, 2010a; RASSI Jr et al., 2010). Inicialmente, a doença de Chagas foi considerada como um fenômeno enzoótico restrito ao ambiente silvestre. No entanto, com o desmatamento e outras atividades econômicas, o homem invade este habitat, deslocando animais e construindo habitações, permitindo, assim, a domiciliação do inseto triatomíneo vetor. Algumas espécies, como o *Triatoma infestans*, estão hoje domiciliadas, enquanto outras encontram-se variando entre habitat selvagem, domiciliar ou peri-domiciliar (COURA, 2007).

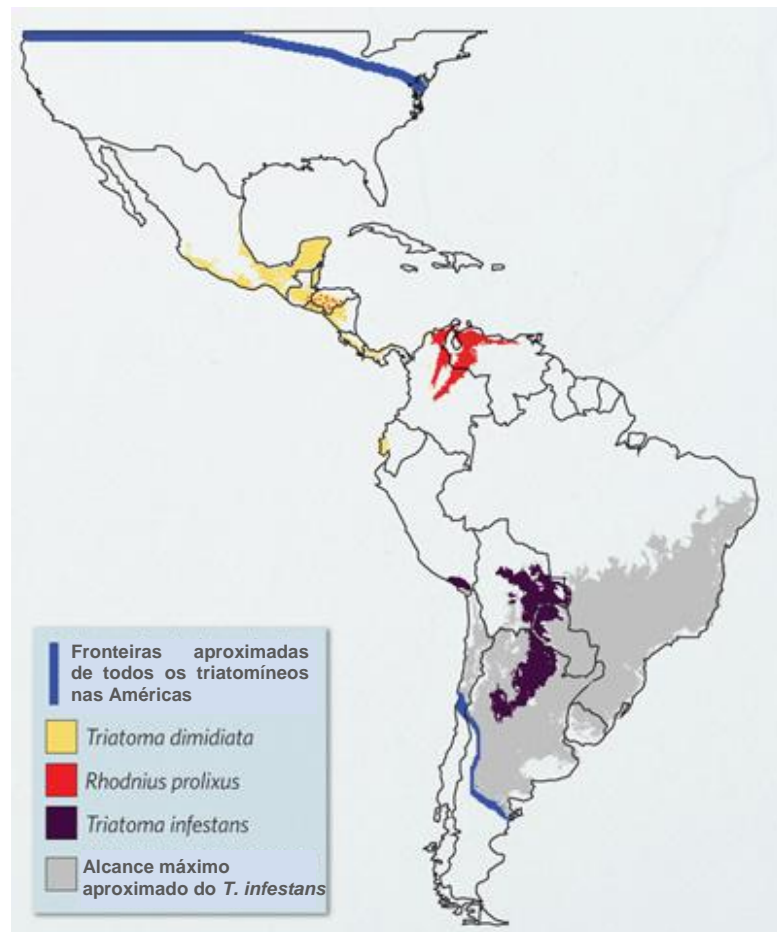
Apesar do grande número de triatomíneos identificados, mais de 130 espécies, só uma pequena parcela pode transmitir o *T. cruzi*. As três espécies de vetores mais importantes para a transmissão desse patógeno ao homem são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (COURA; VIÑAS, 2010). O *T. infestans* tem sido o principal vetor nas regiões endêmicas (sul da América do Sul). Já o *R. prolixus* é encontrado geralmente na América Central e no norte da América do Sul, assim como uma parte do *T. dimidiata*, que também é encontrado no México (**Figura 1**) (RASSI Jr et al., 2010). Outros vetores significativos incluem *Triatoma brasiliensis* no nordeste do Brasil, *Rhodnius ecuadoriensis* no sul do Equador e noroeste do Peru, *Rhodnius pallescens* no Panamá e noroeste da Colômbia, e membros dos complexos *Triatoma phyllosoma* e *Triatoma protracta* amplamente distribuídos no México (WHO..., 2010). No Brasil, a transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* foi oficialmente eliminada em 2006 e, conseqüentemente, a transmissão por vetores silvestres como *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus* e

Panstrongylus lignarius surgiu. Esse comportamento tem preocupado a população de cidades próximas a florestas, como é o caso da Amazônia, onde a transmissão oral tem concentrado o maior número de casos, dos 330 casos no país entre 2005 e 2007, 272 foram dessa região (PETHERICK, 2010).

Existem várias maneiras de adquirir doença de Chagas por via oral, como a ingestão do leite materno infectado; de carne crua ou mal passada de animais infectados; de alimentos contaminados com triatomíneos infectados e/ ou suas fezes; e dos triatomíneos em si. Os sintomas da doença de Chagas aguda são piores quando o próprio parasita é ingerido devido a sua maior infectividade por via oral e sua capacidade de penetrar a membrana mucosa. De fato, um surto que chamou atenção foi o de Santa Catarina em 2005, no qual cinco pessoas morreram. Mas o maior surto confirmado da transmissão oral foi em uma escola municipal na Venezuela, onde 128 casos positivos foram confirmados, com uma morte, e a causa provável foi a ingestão de suco de fruta contaminado (PEREIRA et al., 2009; PETHERICK, 2010).

A doença de Chagas também pode ser transmitida ao homem por transfusão de sangue e de mãe para filho, principais formas de infecção em zonas urbanas e em países não endêmicos (CLAYTON, 2010a). O risco de aquisição da doença após a transfusão de sangue de um doador infectado é inferior a 10-20%, e vai depender da concentração de parasitas no sangue do doador, o componente de sangue transfundido e a cepa do parasita. As taxas de contaminação nos bancos de sangue em algumas cidades do continente americano variam de 3% a 53%, indicando que a prevalência de sangue contaminado por *T. cruzi* pode exceder a prevalência de HIV e vírus da hepatite B e C. A ocorrência da transmissão congênita também apresenta-se bastante variável entre os países, o que pode ser explicado pelo estado imunológico das mães infectadas, fatores placentários, cepa do parasita e as diferentes metodologias utilizadas para a detecção de casos congênitos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; RASSI Jr et al., 2010).

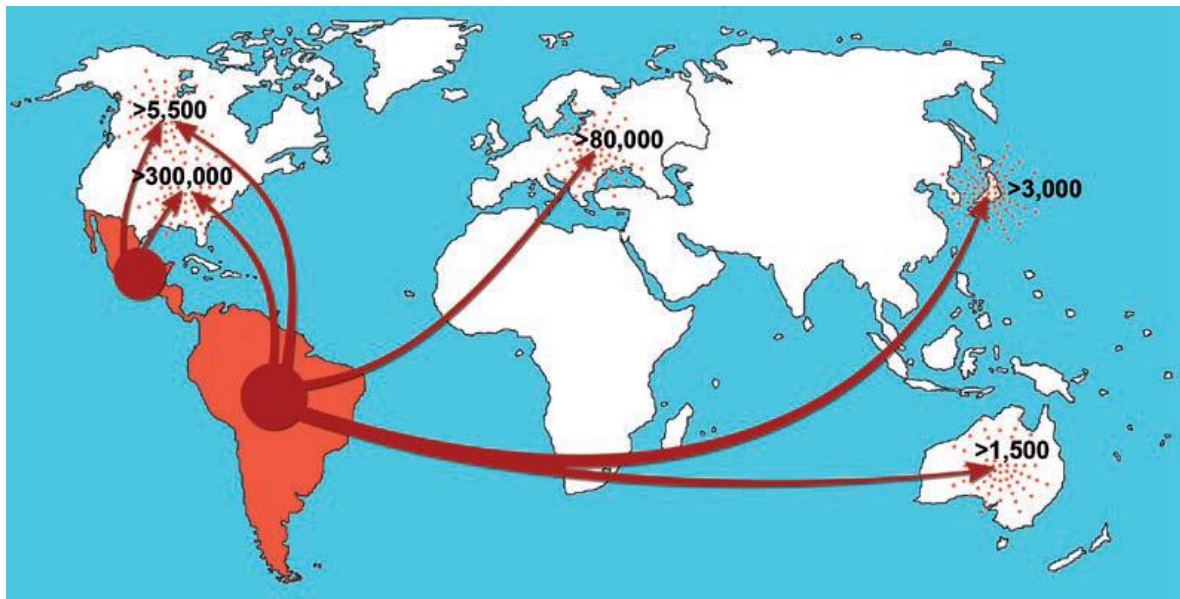
Figura 1- Distribuição vetorial dos três principais vetores domésticos da doença de Chagas.



Fonte: Publicação da revista Nature (WHO..., 2010).

O *T. cruzi* pode circular de países endêmicos para não-endêmicos como a América do Norte, a região do Pacífico ocidental e a Europa (principalmente na Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça). Estima-se que exista atualmente mais de 300.000 indivíduos infectados com o *T. cruzi* nos Estados Unidos, mais que 5.500 no Canadá, acima de 80.000 na Europa e na região do Pacífico ocidental, acima de 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália (**Figura 2**). Como nos países desenvolvidos os vetores da doença não estão presentes, as principais formas de transmissão são por transfusão sanguínea e transmissão congênita, ficando o transplante de órgãos e os acidentes de laboratório num grupo de menor risco (COURA; VIÑAS, 2010).

Figura 2 - Fluxo de migração a partir da América Latina para os países não endêmicos, com estimativa do número total de indivíduos infectados.



Fonte: Coura e Viñas (2010).

Dessa forma, fica clara a necessidade de ampliar a informação e os sistemas de vigilância a nível nacional e supranacional, implementar cuidados médicos para pacientes com doença de Chagas em países não endêmicos, melhorar o controle nos bancos de sangue e transplante de órgãos, bem como interceptar a transmissão vertical. A doença de Chagas tornou-se mais do que uma doença simplesmente zoonótica que afeta a população rural da América Latina: é uma preocupação mundial que pode ter consequências graves para a saúde humana a longo prazo (COURA; VIÑAS, 2010).

1.1.1 A Patologia da doença de Chagas

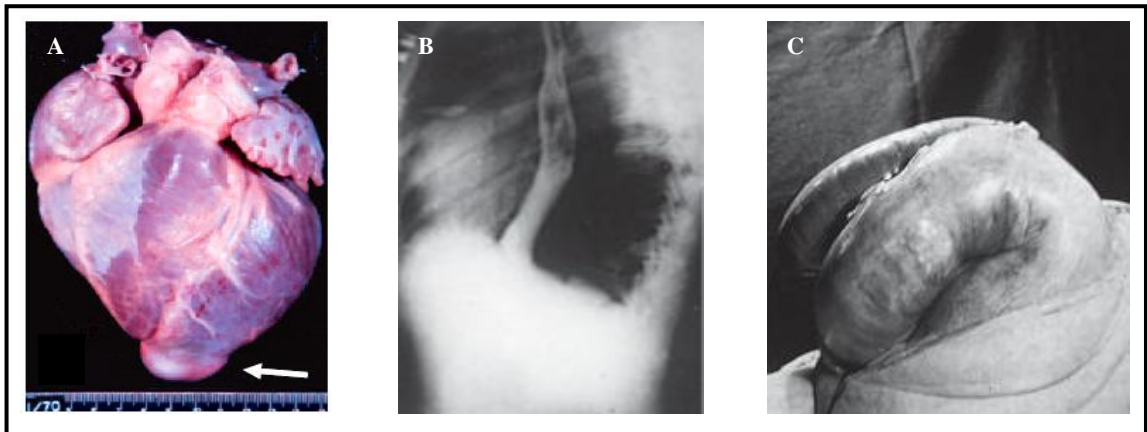
Uma vez que o indivíduo tenha sido infectado, a doença de Chagas pode assumir duas formas clínicas principais: aguda e crônica. Logo após a infecção, o indivíduo entra na fase aguda ou inicial da doença, com duração média de dois a três meses, sendo tipicamente assintomática ou associada a febre e outras manifestações clínicas menos específicas. No entanto, o coração é drasticamente parasitado, o que provoca uma intensa migração e extravasamento de monócitos do sangue para a região. Os monócitos se diferenciam em macrófagos e fagocitam os parasitas, inibindo sua replicação e ativando o sistema imune ao produzir citocinas e fatores co-estimulatórios, dando início a uma reação inflamatória no local (MELO, 2009). Em alguns casos, pode haver hiperplasia nos gânglios linfáticos, fígado e

baço. Em outros casos, ou concomitantemente, pode haver miocardite aguda difusa, com edema intersticial, hipertrofia de fibras miocárdicas, e dilatação das cavidades cardíacas (COURA, 2007).

Na ausência de um tratamento específico, a proporção de óbitos é de 10-15%, e 10-50% dos sobreviventes evoluem para uma longa fase crônica, que inicialmente é assintomática, sem alterações eletrocardiográficas e/ ou radiológicas no coração, esôfago ou cólon, e tem sido descrita como a "forma crônica indeterminada" (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). Após vários anos de infecção assintomática, 20%-30% dos infectados desenvolvem lesões cardíacas e 5%-10% desenvolvem danos digestivos (**Figura 3**). Além do mais, pacientes imunocomprometidos podem apresentar acometimento nervoso central.

Na fase crônica da doença, ocorre uma grande redução no número de neurônios do plexo mioentérico, principalmente no esôfago e no cólon, induzindo a perda de movimentos peristálticos e dilatação desses órgãos promovendo a formação do megaesôfago, megacólon e ampliações de outras vísceras, como bexiga, ureter e vesícula biliar (COURA, 2007). Apesar das condições clínicas originadas pelo megaesôfago e megacólon, a cardiomiopatia chagásica é de longe a forma mais grave da doença. Quando presente, pode levar a morte súbita, arritmias complexas, aneurismas ventriculares, insuficiência cardíaca e tromboembolismo. Os desarranjos autonômicos e distúrbios microcirculatórios constituem peculiaridades de destaque na cardiomiopatia chagásica. No entanto, o seu papel na patogênese de lesões crônicas do miocárdio parece ser somente auxiliar. Acredita-se que os fatores fundamentais sejam a persistência do parasita, causando uma incessante infecção sistêmica, além de fatores imunológicos, os quais participam através de uma reação autoimune (GUTIERREZ et al., 2011; MARIN-NETO et al., 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

Figura 3 – Achados clínicos da doença de Chagas.



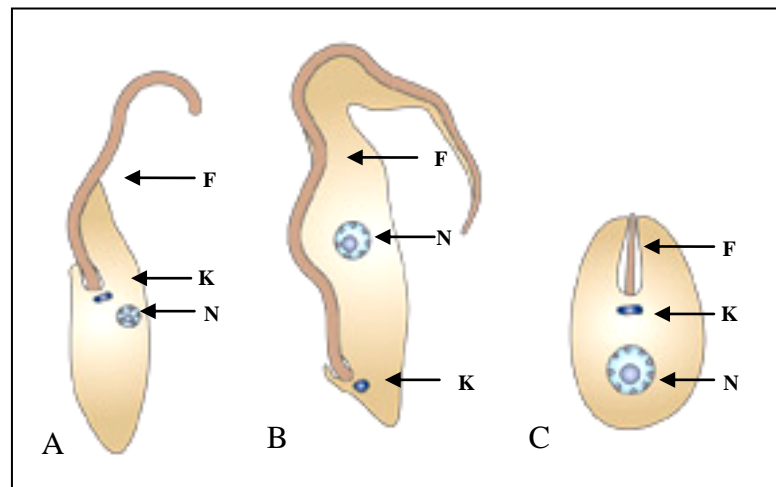
Fonte: Marin-Neto et al. (2007), Coura, 2007

Legenda: (A) Visão externa de um coração chagásico com aneurisma apical típico (seta); (B) Megaesôfago e (C) mega-colon.

1.1.2 O Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, como os demais tripanosomatídeos, possui uma morfologia bastante variável durante os seus diversos estádios do seu ciclo de vida, representando uma adaptação ao meio extra e intracelular encontrados nos hospedeiros (SOUZA, 2002). Desta forma, eles são primariamente classificados de acordo com 1) a morfologia geral da célula; 2) posição do cinetoplasto (região especializada da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial, ou k-DNA) e do sistema flagelar em relação ao núcleo e 3) localização nos hospedeiros. Segundo estes critérios, as principais formas evolutivas do *T. cruzi* são: epimastigota, tripomastigota e amastigota (esferomastigota) (**Figura 4**). Os epimastigotas constituem a forma evolutiva proliferativa, encontrada no intestino do hospedeiro invertebrado, podendo também ser facilmente cultivada em meios axênicos. Têm como características o corpo celular alongado, flagelo livre anteriormente e cinetoplasto em forma de bastão anterior ao núcleo (**Figura 4A**). Já os tripomastigotas sanguíneos apresentam o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo, com o flagelo emergindo lateralmente à bolsa flagelar e aderindo ao longo do corpo do parasito, tornando-se livre na região anterior (**Figura 4B**). Os amastigotas, exclusivamente intracelulares em células de mamíferos, apresentam morfologia arredondada, flagelo curto e cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo (**Figura 4C**).

Figura 4 - As formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



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

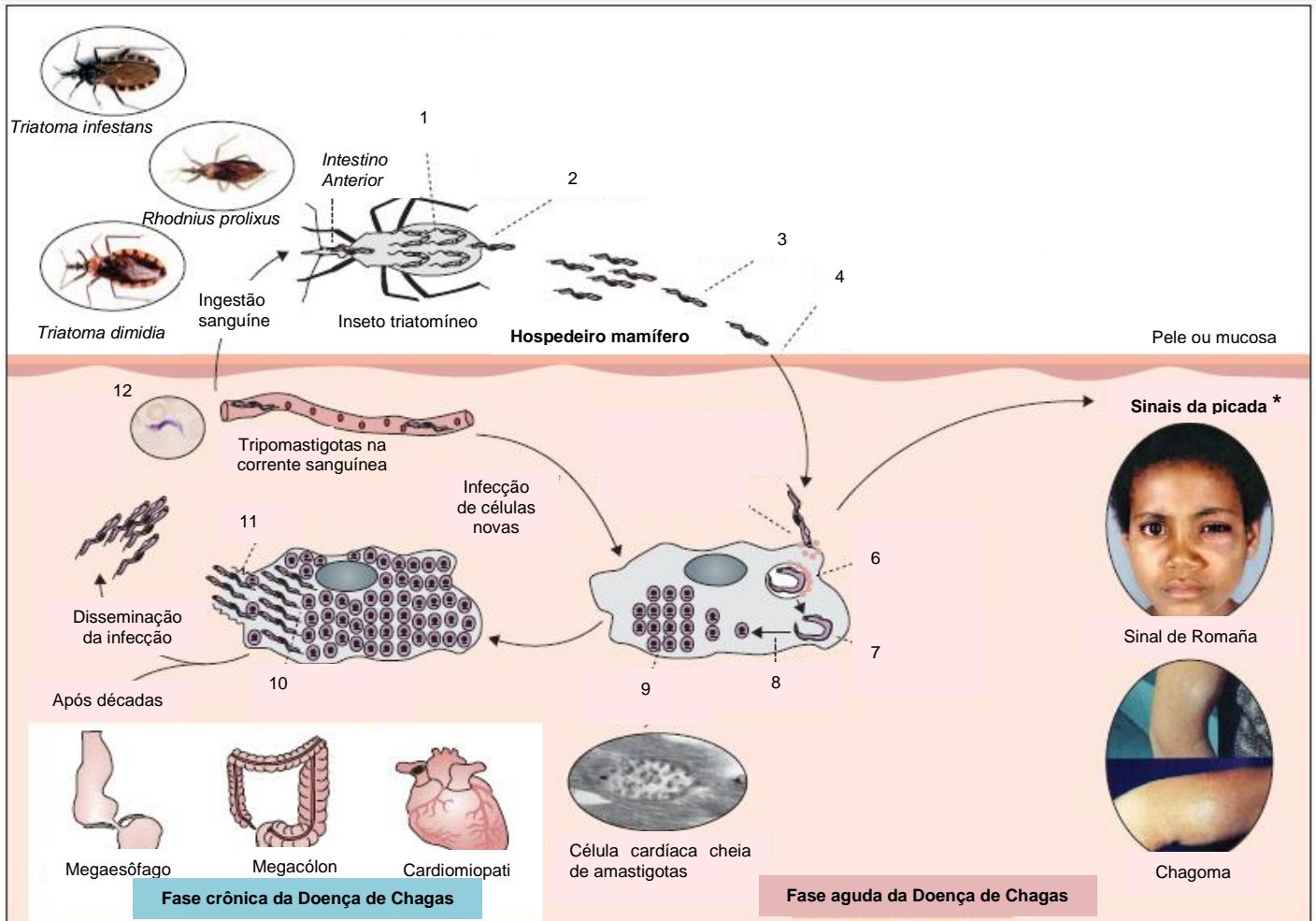
Legenda: (A) Epimastigota, (B) Tripomastigota e (C) Amastigota. N= Núcleo, F= flagelo e K= cinetoplasto.

O parasita *T. cruzi* alterna o seu ciclo de vida entre os mamíferos e triatomíneos. O ciclo no hospedeiro invertebrado começa quando o triatomíneo suga o sangue de vertebrados contaminados (humanos ou mamíferos selvagens, como os marsupiais e os tatus) contendo tripomastigotas sanguíneas (**Figura 5**). No estômago do triatomíneo, as formas tripomastigotas se transformam em amastigotas (esferomastigotas) redondas, e subseqüentemente em epimastigotas. Estes últimos se dividem na porção média do estômago, aderem-se às células intestinais e se transformam em tripomastigotas metacíclicas altamente infectivas, que são liberadas juntamente com as fezes e urina e transmitidas ao hospedeiro vertebrado mamífero (SOUZA, 2008).

O parasita é capaz de penetrar no novo hospedeiro vertebrado através de uma solução de continuidade se a pele estiver rompida ou ainda através das mucosas. A penetração da mucosa ocular por tripomastigotas infectantes leva à uma reação indolor da conjuntiva, com edema das pálpebras e linfadenite dos gânglios pré-auriculares (sinal de Romaña); uma picada em qualquer outra parte da pele pode levar a uma reação no tecido subcutâneo com edema local e endurecimento, congestão vascular e infiltração celular (chagoma) (DIAS, 2007; RASSI Jr et al., 2010). No hospedeiro vertebrado, formas tripomastigotas metacíclicas penetram na pele ou mucosa, onde podem ser fagocitadas pelos diversos tipos de célula encontrados no local. Após a internalização, o meio ácido gerado pela fusão dos lisossomos da célula hospedeira ativa uma proteína secretora do tipo porina, promovendo o escape de formas tripomastigotas do vacúolo fagocítico e sua diferenciação simultânea em formas amastigotas replicativas (ANDREWS, 2002). Posteriormente, as formas amastigotas

começam a se dividir em contato direto com estruturas citoplasmáticas. Após inúmeros ciclos de divisão, um grande número de amastigotas pode ser encontrado nas células do hospedeiro, e essas podem persistir latentes no corpo do hospedeiro por décadas, escondidas em células musculares sem causar dano significativo aos tecidos (TEIXEIRA et al., 2006). Todavia, devido a um estímulo ainda não caracterizado, os amastigotas podem se transformar em tripomastigotas, os quais rompem a membrana das células do hospedeiro e são liberados no espaço intercelular, onde podem infectar outras células no próprio ambiente, ou atingir a corrente sanguínea e distribuir-se por todo o organismo. Eventualmente, formas tripomastigotas sanguíneas podem ser ingeridas pelo vetor, começando um novo ciclo.

Figura 5 - Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



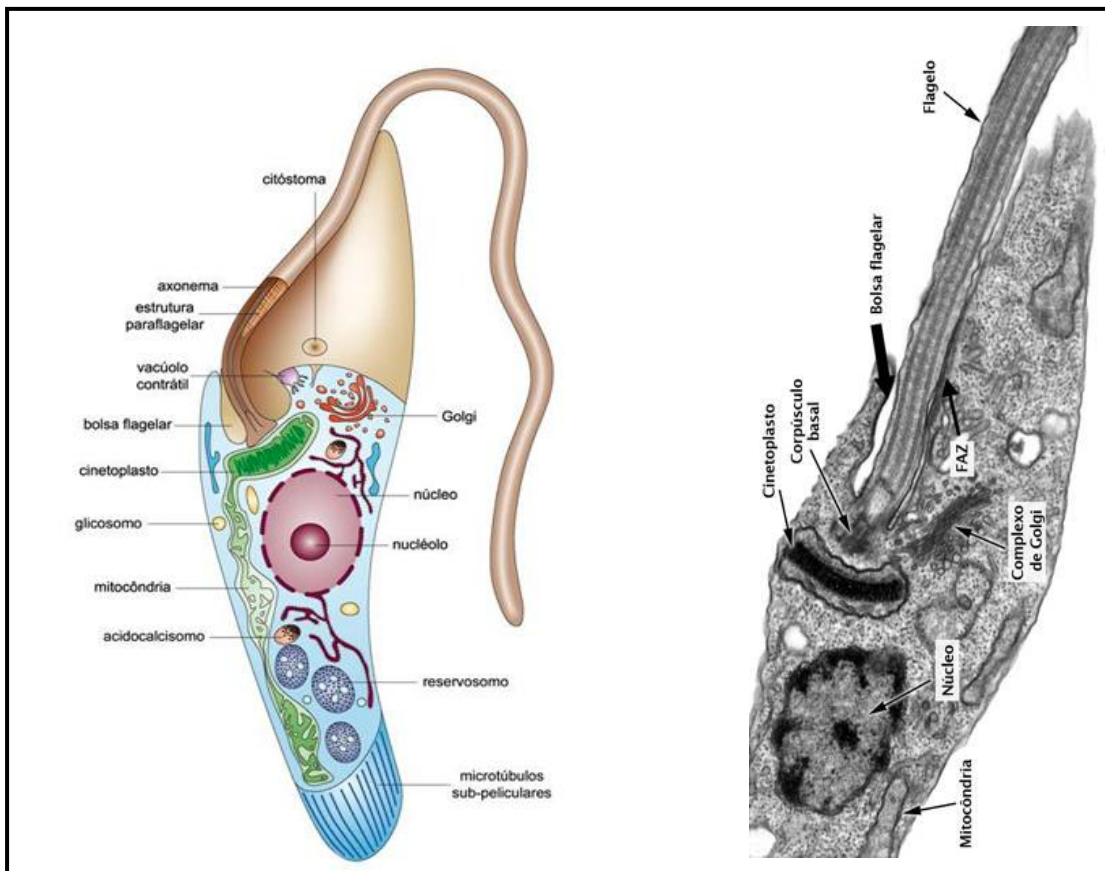
Fonte: Adaptado de Rassi et al. (2009 apud RASSI Jr et al., 2010, p. 1309).

Legenda: (1) Tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto se diferenciam em epimastigotas, e estas se replicam no intestino médio; (2) Epimastigotas migram para o intestino posterior e o reto, e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas pelas fezes; (3) Tripomastigotas metacíclicas infectantes liberadas na pele de um hospedeiro mamífero; (4) Tripomastigotas metacíclicas entram no hospedeiro quando este coça ou esfrega o local da picada; (5) Recrutamento e fusão de lisossomos da célula hospedeira; (6) Forma tripomastigota encontrada no interior do vacúolo parasitóforo; (7) Tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo e são liberadas no citoplasma; (8) Tripomastigotas se diferenciam em amastigotas; (9) As amastigotas se dividem por divisão binária; (10) Quando a célula hospedeira está cheia de amastigotas, elas se transformam em tripomastigotas; (11) As tripomastigotas lisas invadem as células infectadas, invadem os tecidos adjacentes, e se espalham através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para outros locais, onde passam por novos ciclos de multiplicação intracelular. (12) Eventualmente, tripomastigotas sanguíneas são ingeridas por outro inseto durante seu repasto sanguíneo começando um novo ciclo.

1.1.3 A Biologia Celular do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* possui organelas comuns a outras células eucarióticas, tais como núcleo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, enquanto outras lhe são peculiares, podendo servir de alvos potenciais para agentes quimioterápicos. Algumas delas serão vistas com maiores detalhes a seguir. Um esquema ilustrativo da organização intracelular do *Trypanosoma cruzi* (forma epimastigota) é apresentado na **Figura 6**.

Figura 6 – Representação da estrutura interna da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de DoCampo et al. (2005) e Teixeira et al. (2011).

Legenda: (A) Representação esquemática da seção longitudinal da forma epimastigota de *T. cruzi*.

(B) Micrografia de uma forma epimastigota observada em microscópio eletrônico de transmissão. FAZ= zona de adesão.

1.1.3.1 O cinetoplasto e a mitocôndria

Os tripanosomatídeos apresentam uma única e ramificada mitocôndria, que se estende logo abaixo da camada de microtúbulos subpeliculares e corre por todo o corpo celular do parasita. Uma característica peculiar da mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida, é que o DNA mitocondrial (k-DNA) concentra-se em uma região especializada da mitocôndria denominada cinetoplasto. O k-DNA representa aproximadamente 30% do DNA total da célula e difere do DNA nuclear na densidade, tipo de bases nitrogenadas e grau de desnaturação (SOUZA, 2008). Ao contrário de outros DNAs encontrados na natureza, o k-DNA de tripanosomatídeos é composto de moléculas circulares, as quais são relaxadas e interconectadas para formar uma pequena rede. Dois tipos de moléculas de DNA estão presentes no cinetoplasto, os minicírculos e os maxicírculos (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Os maxicírculos são funcionalmente homólogos ao DNA mitocondrial de outros eucariotos, pois codificam RNAs ribossomais para inúmeras proteínas, a maioria envolvida na transdução de energia. A característica mais intrigante dos maxicírculos é o fato da maior parte dos seus transcritos sofrer um processo de edição (“editing”) antes de se transformarem em RNAs funcionais. Os minicírculos respondem por aproximadamente 90% do total da massa de DNA mitocondrial e sua principal função é codificar pequenos RNAs guias que, por sua vez, controlam a especificidade de edição do RNA nesta organela (SCHNEIDER, 2001).

1.1.3.2 Os reservossomos

Os reservossomos são organelas encontradas na região posterior de formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando uma matriz homogênea, onde inclusões lipídicas estão imersas (SOARES et al., 1992). Estudos têm demonstrado que estas organelas participam do armazenamento de proteínas endocitadas pelo parasita e que, durante a diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas, estas organelas desaparecem gradualmente, sugerindo que o conteúdo armazenado nestas estruturas seja utilizado como fonte de energia para o processo de diferenciação (FIGUEIREDO et al., 2004). Os reservossomos também têm sido caracterizados pela presença de proteases sintetizadas pelo parasita, como a cisteína proteinase, bem como pela presença de pequenas GTPases (SILVA et al., 2006).

1.1.3.3 Os acidocalcisomos

São estruturas vacuolares que podem ser vistas no microscópio eletrônico de transmissão contendo um depósito elétron-denso designado como grânulos de polifosfato ou volutina. Os acidocalcisomos são geralmente esféricos, com diâmetro médio de 0,2-0,6µm, e podem ser observados também por microscopia de fluorescência utilizando DAPI ou laranja de acridina (fluorocromos que se acumulam em compartimentos ácidos) (DOCAMPO; MORENO, 2011). Eles estão envolvidos em várias funções incluindo: reserva de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro, compostos fosfatados, especialmente pirofosfato inorgânico e polifosfato, como determinado por análise bioquímica e microanálise de raio X, bem como na homeostase do pH e osmorregulação, em associação com o vacúolo contrátil (DOCAMPO et al. 2005).

1.1.3.4 Os glicossomos

A observação, através da microscopia eletrônica, de secções finas em inúmeras espécies de tripanosomatídeos revelou a presença de estruturas esféricas, envoltas por uma unidade de membrana e com uma matriz homogênea. Esta organela, reconhecida depois de 1960, foi assim designada por apresentar em seu citosol a maioria das enzimas envolvidas na via glicolítica. Ao contrário da mitocôndria, os glicossomos não apresentam material genético em seu interior, sendo todas as proteínas encontradas codificadas por genes nucleares (SOUZA, 2008).

1.1.3.5 Os microtúbulos sub-peliculares

Nos tripanosomatídeos, os microtúbulos estão organizados em arranjos citoplasmáticos paralelos, encontrados exclusivamente na periferia do protozoário. Análises por congelamento rápido, criofratura entre outras (HEUSER, 2001), mostraram que esses microtúbulos estão conectados uns com os outros através de filamentos, bem como à parte interna da membrana plasmática e às cisternas periféricas do retículo endoplasmático, recebendo assim, a denominação de microtúbulos subpeliculares. Estas estruturas são resistentes à baixas temperaturas, bem como a inúmeras drogas empregadas usualmente na ruptura de microtúbulos, como colchicina, colcemide, taxol, etc (SOUZA, 2008).

1.1.4 A Quimioterapia da doença de Chagas

Atualmente apenas duas drogas são recomendadas para o tratamento da doença de Chagas, o benznidazol (Rochagan®, Radanil®) e o nifurtimox (Lampit®). O benznidazol (BNZ) tem sido usado na terapia humana desde 1978 e tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de RNA e a geração e acúmulo de superóxidos. O Nifurtimox é um nitrofurano, também utilizado desde 1970, e age sobre o parasita por causar danos ao DNA através do acúmulo de radicais livres e superóxidos (LOUP et al., 2011). Estas drogas são recomendadas na fase aguda, mas sua eficácia na fase crônica tem sido questionada. Além do mais, o Nifurtimox teve sua produção descontinuada no Brasil e em outros países da América Latina e o Benznidazol causa uma série de efeitos colaterais, com atividades mutagênicas e carcinogênicas. Ao mesmo tempo, muitas comunidades rurais pobres em países endêmicos têm pouca infraestrutura de serviços de saúde ou apoio para os pacientes completarem o tratamento, que tanto reduz a eficácia da droga e incentiva a resistência às drogas (CROFT, 1999; URBINA; DOCAMPO, 2003).

As pesquisas baseadas em novas terapias para a doença de Chagas estagnaram em parte por causa de uma falta de compromisso do governo, e em parte porque a indústria farmacêutica viu pouco incentivo financeiro no tratamento de doenças tropicais. As drogas candidatas a novos medicamentos também apresentam um desafio extra porque o *T. cruzi* é um parasita intracelular, sendo necessário atravessar a membrana plasmática da célula infectada a fim de eliminá-lo. Outra questão problemática é certificar a eficácia de drogas, já que fica difícil detectar a presença ou ausência do parasita utilizando esfregaço sanguíneo e microscopia convencional, particularmente para pacientes que tem a doença crônica em que os parasitas residem principalmente no intestino, coração e outros tecidos profundos. Os testes sorológicos tradicionais também parecem ser ineficientes para indicar a cura, pois os anticorpos podem persistir por vários anos no organismo após a eliminação do parasita até que se obtenha um teste “soro- negativo”. Até mesmo os testes com PCR, que apresentam alta sensibilidade, não parecem possuir uma acurácia suficiente para a detecção de baixos níveis de parasitas circulantes na fase crônica, não podendo ser utilizada para verificar a cura, mas sim falha terapêutica (um teste positivo após o tratamento) (BERN, 2011; CLAYTON, 2010b; LOUP et al., 2011).

Uma estratégia é explorar drogas já aprovadas para outras condições como o Posaconazol, que é apenas um dos vários antifúngicos que poderiam ser eficazes para a doença de Chagas. Este composto induziu cura parasitológica em modelos murinos na fase

aguda e crônica da doença, no entanto, apresenta alto custo e difícil síntese. Tendo em vista o fato de que a doença de Chagas acomete justamente parcelas da população menos favorecidas economicamente, a utilização deste medicamento ainda seria limitada por pacientes de países endêmicos (CLAYTON, 2010b; URBINA; DOCAMPO, 2003). Outra droga a amiodarona, que é usada rotineiramente para o tratamento de arritmia cardíaca, também é capaz de matar seletivamente o *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*, e mostrou atividade sinérgica com o posaconazol ao afetar a homeostase do cálcio e bloquear a biossíntese do ergosterol (BENAIM et al., 2006).

Uma problemática comum aos quimioterápicos é a sua falta de seletividade contra o agente agressor o que resulta em efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes. Neste sentido, estudos sobre a fisiologia e bioquímica do *T. cruzi* tem buscado selecionar estruturas e moléculas específicas do parasita como alvos seletivos para ação de novas drogas. Estes estudos levaram ao conhecimento de várias enzimas cruciais para a sobrevivência do parasita como alvos potenciais para a concepção de novos medicamentos. As proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas e peptídeos. Em protozoários como o *T. cruzi*, as proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasita do sistema imune do hospedeiro. Considerando-se o papel essencial dessa classe de enzimas no ciclo de vida do *T. cruzi*, algumas proteases têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes anti-chagásicos (DIAS; DESSOY, 2009).

A cruzipaina do *T. cruzi* (TCC) é um membro da superfamília papaína de cisteína proteases que tem como função degradar componentes da matriz extracelular, além de estar envolvida na replicação e nutrição do parasita (SANTOS et al., 2009). Um candidato a inibidor da cruzipaina é o K777, que provou ser eficaz tanto em modelos de infecção agudos e não agudos em ratos, e também conseguiu melhorar dano cardíaco em cães infectados (MCKERROW, 2009). A transialidase do *T. cruzi* (TcTS) está relacionada com o mecanismo de evasão do parasita frente a resposta imune do hospedeiro, principalmente através da transferência de resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para a superfície do parasita. Apesar de sua importância para a patogênese da doença de Chagas e sua emergência como um alvo potencial da droga, a inibição desta enzima revelou-se um desafio uma vez que e inibidores químicos específicos de TcTS ainda não são conhecidos (NERES et al., 2009). A atividade da dihidrofolato redutase (DHFR) do *T. cruzi* (TcDHFR) também é essencial para o parasita, representando um alvo potencial para o desenho racional de

medicamentos. No entanto, a exemplo das transialidases muito poucos inibidores de alta afinidade da TcDHFR têm sido relatados (SCHORMANN et al., 2010).

Uma via que tem sido particularmente útil para a identificação de novos alvos contra o *T. cruzi* é a via do isoprenóide (SZAJNMAN et al., 2008). A farnesil difosfato sintase (FPPS) catalisa a condensação sucessiva de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) para gerar geranyl difosfato (GPP) e depois farnesil difosfato (FPP). GPP e FPP são precursores da maioria dos compostos isoprenóides, incluindo o colesterol e outros esteróis (GABELLI et al., 2006; HUANG et al., 2010). Pelo exposto, fica claro o potencial dessa enzima em ser alvo de drogas contra parasitas patogênicos. A farnesil difosfato sintase de *T. cruzi* (TcFPPS), por exemplo, tem sido alvo de alguns bisfosfonatos, como o Risendronato (Actonel), alendronato (Fosamax) e pamidronato (Aredia). A atividade antiparasitária destes compostos tem sido atribuída à inibição da enzima FPPS da via do ácido mevalônico dos protozoários (MUKHERJEE et al., 2008; ROSSO et al., 2011; SZAJNMAN et al., 2008). Com base nesses estudos, a inibição da FPPS dos parasitas pode ser considerada como um alvo viável para o desenvolvimento de novas terapias tripanocidas.

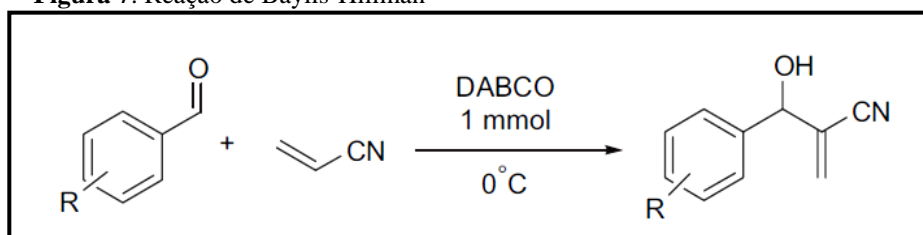
Apesar de haver muitos outros alvos enzimáticos potenciais em *T. cruzi*, a dificuldade de estabelecer ensaios *in vitro* confiáveis e reprodutíveis tem dificultado os esforços para a triagem de novos compostos que possam funcionar como inibidores enzimáticos. Além disso, a criação e execução dos ensaios e o posterior teste dos compostos em diferentes épocas e concentrações necessita de um grande espaço de tempo. Uma alternativa pode ser o uso de ensaios de alto rendimento, que aumenta a velocidade em que novos compostos podem ser avaliados (CLAYTON, 2010b). Neste sentido o uso da ferramenta de *docking* molecular, *in silico*, pode auxiliar na procura dos inibidores para essas enzimas de forma mais rápida ao prever a ligação dos possíveis inibidores a seus respectivos alvos.

1.2 Adutos derivados da Reação Morita-Baylis-Hillman

Considerando a importância da doença de Chagas no contexto da saúde pública mundial, a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2002) estabelece que uma droga ideal para o tratamento desta doença deve preencher os seguintes requerimentos: a) Ser efetiva nas diferentes formas clínicas e estágios de desenvolvimento da doença; b) Ser efetiva em dose única ou em poucas doses; c) ser acessível aos pacientes; d) Não apresentar efeitos colaterais ou carcinogênicos; e e) não apresentar resistência. Tendo em vista as atuais drogas utilizadas no tratamento desta endemia não atenderem a praticamente nenhum destes requisitos, a procura por novos fármacos ainda se faz necessária.

A reação Morita-Baylis-Hillman, ou simplesmente Baylis-Hillman, é uma reação de síntese de ligações carbono-carbono versátil e átomo-econômica, que fornece moléculas polifuncionais conhecidas como adutos Morita-Baylis-Hillman (MBHA). Essa reação envolve a ligação de alquenos contendo um grupo elétron-retirador (GER), com aldeídos, cetonas ou iminas (**Figura 7**). Aminas terciárias são normalmente utilizadas como catalisadoras e 1,4-diazobicíclico[2.2.2.]octano (DABCO) é a escolha usual (DAS et al., 2006).

Os adutos possuem características que permitem fazer transformações moleculares e originar um grande espectro de moléculas. Estas características podem ser atribuídas à 1) simplicidade operacional na sua síntese, através de ligações carbono-carbono; 2) seus aspectos estruturais versáteis com a possibilidade de se desenvolver versões assimétricas e intramoleculares; e também 3) o largo espectro de aplicação destes adutos. Este último devido à proximidade de seus três grupos quimio-específicos, permitindo um grande número de transformações metodológicas e processos estereo-seletivos que podem levar a síntese de moléculas de importância médica (BASAVIAH et al., 2007).

Figura 7. Reação de Baylis-Hillman

Fonte: Barbosa et al. (2009).

Estudos envolvendo a reação Morita-Baylis-Hillman reforçam a importância de se investigar a atividade biológica dos seus adutos aromáticos contra parasitas e vetores que transmitam doenças tropicais. Estes compostos foram ativos contra parasitas da malária (SOUZA et al., 2004; KUNDU et al., 1999), contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*, agente vetor da esquistossomose (VASCONCELLOS et al., 2006) e contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* (BARBOSA et al., 2011), no entanto estudos desses adutos contra o agente patogênico da doença de Chagas ainda são escassos.

1.3 Morte Celular Programada

O processo de morte celular programada (MCP) é um processo ativo, geneticamente regulado, de importância central na homeostase de organismos multicelulares, desempenhando papel fundamental na morfogênese, fisiologia e defesa do hospedeiro contra patógenos (MACFARLANE, 2009). Apesar de ter sido considerada exclusiva de organismos multicelulares há evidências crescentes que apontam para uma conservação evolutiva da MCP em eucariotos unicelulares, como *Giardia lamblia* (CHOSE et al., 2003), *Blastocystis hominis* (NASIRUDEEN et al., 2004), *Trichomonas vaginalis* (CHOSE et al., 2002), *Plasmodium falciparum* (PICOT et al., 1997) e parasitas do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* (DUSZENKO et al., 2006; SHAHA, 2006; DUSZENKO et al., 2011).

A força motriz para o desenvolvimento da MCP em protozoários, como os tripanosomatídeos, por exemplo, pode ser o controle da densidade populacional para alcançar uma parasitemia persistente e garantir a sobrevivência do hospedeiro, pelo menos até que a transmissão do parasita para o próximo hospedeiro esteja garantida. Dessa forma, a capacidade determinada geneticamente desses protozoários de se submeter a MCP é um pré-requisito para a sobrevivência do parasita em termos evolutivos (DUSZENKO et al., 2006).

De fato, eventos de MCP têm sido descritos em *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi* em resposta aos mais variados estímulos, tais como, choque térmico, privação de nutrientes, tratamento com H₂O₂, tratamento com peptídeos antimicrobianos, diamidinas, entre outros (DAS et al., 2001; BERA et al., 2003; SOUZA et al., 2006; ROY et al., 2008).

Os principais tipos de morte celular, os quais já são bem caracterizados nas células eucarióticas superiores, incluem os fenômenos de apoptose, autofagia e necrose (GUIMARÃES; LINDEN, 2004). O termo apoptose (MCP I) foi descrito primeiramente por Kerr e colaboradores (1972) a fim de diferenciar a morte celular que ocorre naturalmente no desenvolvimento celular, daquela causada por necrose, que resulta da lesão aguda do tecido. A apoptose foi então caracterizada como um processo regulado de morte celular, envolvido no desenvolvimento e morfogênese normal de tecidos e órgãos em organismos multicelulares e também responsável pelo desenvolvimento de várias patologias. Uma vez iniciado, esse processo é bastante semelhante entre as espécies (DE SOUZA et al., 2010), exibindo várias alterações morfológicas, incluindo: a clivagem proteolítica pelas caspases, o encolhimento das células, a fragmentação do DNA, a exposição da fosfatidilserina, a formação de corpos apoptóticos e a perda do potencial da membrana mitocondrial com a liberação de citocromo C no citosol (RICCI; ZONG, 2006). No processo apoptótico dos organismos unicelulares a fragmentação do DNA é observada logo no início, resultando da ação de ortólogos da nuclease mitocondrial Endo G em *Caenorhabditis elegans* (PARRISH et al., 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (BÜTTNER et al., 2007) e tripanosomatídeos (GANNAVARAM et al., 2008).

A autofagia (MCP II) é o principal mecanismo para a degradação de proteínas e organelas (ALVAREZ et al., 2007), no qual os eucariotos, seletivamente ou não, direcionam um processo degradativo lisossomal contra suas próprias organelas, por hidrolases residentes (RIGDEN et al., 2009). Esse processo foi encontrado em representantes de todos os filos eucarióticos: vertebrados (mamíferos, aves, anfíbios, peixes), invertebrados, como o nemátodo *Caenorhabditis elegans*, insetos, plantas, fungos e diversos protistas (DUSZENKO et al., 2011). Quando a MCP II é induzida, uma membrana dupla se forma ao redor de uma porção de citoplasma, resultando na formação de uma estrutura denominada autofagossomo (KIEL, 2010). Os autofagosomos então se fundem aos lisossomos e um autofagolisossomo se forma, dando início à digestão dos resíduos citoplasmáticos. A autofagia é crucial para manter o balanço metabólico e a reciclagem de estruturas celulares durante o crescimento e desenvolvimento da célula (BURSCH, 2001), podendo promover adaptação e sobrevivência durante estresse, como a ausência de nutrientes. No entanto, sob algumas condições as células

podem ser submetidas à morte através de uma resposta autofágica exacerbada (RICCI; ZONG, 2006). A observação da autofagia por microscopia eletrônica de transmissão envolve a visualização de autofagosomo com aparecimento de membranas ao redor de organelas e estruturas citoplasmáticas com sua posterior degradação, sem que haja uma resposta inflamatória (UCHIYAMA et al., 2008).

A necrose (MCP III) é descrita como um evento não apoptótico e tem sido definida como uma forma de morte celular acidental ou patológica, que provoca uma forte resposta inflamatória tecidual, derivada de condições ambientais ou em resposta a perturbações intracelulares (ZONG; THOMPSON, 2006). No entanto, atualmente não há consenso que esse tipo de morte celular seja realmente “não controlada”, e alguns autores afirmam que a necrose é também um processo programado dependente da extensa relação entre eventos bioquímicos e moleculares em diferentes níveis celulares (FESTJENS et al., 2006; ZONG; THOMPSON, 2006; KROEMER et al., 2009; LÜDER et al., 2010).

Diversos mediadores, organelas e processos celulares têm sido implicados na MCP III, mas ainda não está claro como eles se relacionam uns com os outros. O marco deste tipo de morte celular envolve alterações na mitocôndria (desacoplamento, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e permeabilização da membrana mitocondrial); no núcleo (hiperativação de PARP-1 e hidrólise de NAD^+); degradação de lipídios; aumento na concentração citosólica de cálcio (Ca^{2+}), que resultam em sobrecarga mitocondrial; e ativação de proteases não-caspases (como calpaínas e catepsinas) (KROEMER et al., 2009).

Morfologicamente, a MCP III pode ser definida pela observação do inchaço de células e organelas, citoplasma eletriluscente, e perda da integridade da membrana plasmática (ZONG; THOMPSON, 2006). Em termos moleculares a necrose, mas não a apoptose, é frequentemente acompanhada por depleção aguda de ATP, evento considerado causador da morte celular (LAPORTE et al., 2007). A inter-relação entre necrose e apoptose é modulada em resposta a diferentes estímulos, sendo relatado que geralmente muitas injúrias induzem apoptose em baixas doses e necrose em altas doses, porém fenótipos de ambos podem coexistir numa mesma célula (ZONG; THOMPSON, 2006).

Apesar dos diversos fenótipos de MCP já terem sido identificados em protozoários, o ponto de conversão de uma forma de MCP para outra, bem como a inter-relação de diferentes drogas e a MCP ainda são pouco investigados nestes parasitas, representando um ponto crítico ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Desta forma, é necessária uma melhor caracterização destes eventos no sentido de interferir em diferentes etapas da MCP, oferecendo assim alternativas para o controle das doenças causadas por estes patógenos.

2 PERGUNTA CONDUTORA

Qual é o potencial tripanocida e o modo de ação do composto 3-Hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenilpropanonitrilo) (MBHA 3), derivado da reação Morita-Baylis-Hillman, sobre *Trypanosoma cruzi*?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial quimioterápico do composto derivado da reação Morita-Baylis-Hillman contra *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade tripanocida do composto MBHA 3 sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;

- Avaliar, através de microscopia eletrônica de transmissão, as alterações morfológicas induzidas pelo composto MBHA 3 em *T. cruzi*;

- Discriminar os diferentes fenótipos de morte celular programada induzida por MBHA 3 em *T. cruzi*, através de microscopia confocal a laser e citometria de fluxo;

- Avaliar por eletroforese as possíveis alterações no DNA de células tratadas ou não;

4 ARTIGOS

A presente dissertação foi redigida no formato de artigos científicos, tendo em vista que um artigo já foi publicado e o outro ainda será submetido, estando o último sob a forma de manuscrito. Posteriormente iremos levantar as informações contidas em cada um, gerando uma única discussão e tornando possível fazer a conclusão dos principais pontos.

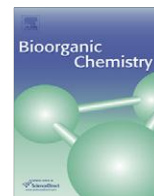
4.1 Artigo 1: 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*.

O primeiro artigo desenvolvido e posteriormente publicado na revista “Bioorganic Chemistry” teve colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Mário L. A. A. Vasconcellos, que sintetizou o composto MBHA 3 e realizou o ensaio de “docking” molecular. Nesse artigo, utilizamos também a microscopia eletrônica de transmissão para identificar as alterações ultraestruturais decorrentes do tratamento com o composto MBHA 3 em *T. cruzi*.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioorg

3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*

Jana M. Sandes^a, Andrezza R. Borges^a, Cláudio G.L. Junior^b, Fábio P.L. Silva^b, Gabriel A.U. Carvalho^c, Gerd B. Rocha^{c,**}, Mário L.A.A. Vasconcellos^{b,**}, Regina C.B.Q. Figueiredo^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil

^b LASOM-PB, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil

^c Laboratório de Química Quântica Computacional (LQCC)-Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2010

Available online 1 July 2010

Keywords:

Morita–Baylis–Hillman adducts

Anti-*Trypanosoma cruzi* activity

ABSTRACT

We have synthesized the Morita–Baylis–Hillman adduct (MBHA) 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)-propanenitrile (**3**) in quantitative yield and evaluated on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and bloodstream trypomastigote forms. Compound **3** strongly inhibited epimastigote growth, with IC₅₀/72 h of 28.5 μM and also caused intense trypomastigotes lysis, with an IC₅₀/24 h of 25.5 μM. Ultrastructural analysis showed significant morphological changes on both parasite forms treated with **3**, including increase of cell volume and rounding of cell body as well as intense intracellular disorganization. Morphological changes indicative of apoptosis, autophagy or necrosis were observed in most affected cells. Docking calculations of **1**, **2** and **3** pointed out the possibility of *T. cruzi* Farnesyl Pyrophosphate Synthase (TcFPPS) enzyme inhibition in **3** mechanism of action.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosomiasis are a widespread group of parasitic diseases that affect over 100 millions of people, especially in the tropical and subtropical countries [1]. American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a major public health concern in Latin America, with over 17 million people infected and at least 40 million individuals at risk of infection, either through contact with an insect vector or via blood transfusion [2]. Chagas disease presents an initial or acute phase with evident parasitemia seen in direct examination of the blood. In most cases there are no symptoms, but in symptomatic cases there are fever, generalized adenopathy, edema, hepatosplenomegaly, myocarditis and meningoencephalitis. This is followed by a chronic phase that in most cases presents as an indeterminate form, which may, in turn, evolve to severe cardiac or digestive disorders [3].

Introduced in the years 1960, the nitroderivative benznidazole (BZL, **1** Fig. 1) (Rochagan[®] and Rodanil[®]) and nifurtimox (Lampit[®]) are the only currently available drugs for treatment of Chagas disease in Latin America. The biochemical basis by which BZL exerts

its trypanocidal activity has not been fully elucidated, but evidence suggests that BZL could interfere with the synthesis of macromolecules via covalent binding or other types of interactions between nitroreduction intermediates and various cellular components, i.e., DNA, lipids, and proteins of *T. cruzi* [4–6]. Although being effective for acute infections, they cause severe side effects, which frequently lead to the treatment discontinuation [7]. Furthermore, the efficacy of treatment during the chronic phase is still controversial with a lack of consensus about the evaluation of parasitological cure [8,9]. Residronate (Actonel[®], **2** Fig. 1) is also an active substance against *T. cruzi* [10]. The mode of action of this bisphosphonate drug involves the inhibition of farnesyl pyrophosphate synthetase (FPPS), an enzyme from the mevalonic acid pathway [11,12].

Despite the high incidence and mortality of this illness, there has been little commercial interest in developing new trypanocidal compounds. Thus, the discovery of new trypanocidal compounds, less toxic than current drugs is still urgently needed [2].

The 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)-propanenitrile (**3**, Fig. 1) is a very simple Morita–Baylis–Hillman adduct (MBHA) [13], which can be prepared in “one-pot” from *p*-nitrobenzaldehyde and acrylonitrile through the Morita–Baylis–Hillman reaction [14,15].

The bioactivity of **3** was first described in 1999, against *Plasmodium falciparum*, the parasite that causes malaria [16]. In 2006, the molluscicidal activities of 10 aromatic MBHA have been determined against *Biomphalaria glabrata* (Say) snails [17], the intermediate

* Corresponding author. Fax: +55 81 2101 2500.

** Corresponding author. Fax: +55 83 3216 7437.

*** Corresponding author. Fax: +55 83 3216 7437.

E-mail addresses: gbr@quimica.ufpb.br (G.B. Rocha), mllaav@quimica.ufpb.br (M.L.A.A. Vasconcellos), bressan@cpqam.fiocruz.br (R.C.B.Q. Figueiredo).

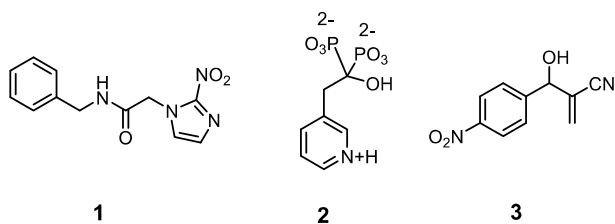


Fig. 1. Chemical structures of BZN (**1**), RIS (**2**) and (±)-3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile (**3**).

host of schistosomiasis, and in the same year, *in vitro* antiproliferative effect on human tumor cell lines were described [18]. Subsequently high *in vitro* leishmanicidal activities against *Leishmania amazonensis* [19] and *Leishmania chagasi* [20] parasites were also described for **3**.

In connection with our continuum interest on organic synthesis of products with biological activity [21–25] our research group has been engaged on the development of several new conditions to produce MBHA in high yields from “one-pot reaction” [26–29], and to explore them as a new class of drugs, especially against neglected tropical diseases such as schistosomiasis [17] and leishmaniasis [19,20]. Since compound **3** has presented several important anti-parasitic activities the purpose of this article is to describe the improvement of the synthesis of **3** and to explore its biological activity against *T. cruzi* epimastigote and bloodstream trypomastigote forms, perhaps suggesting a novel drug prototype against this parasite and begin to make propositions about the compound **3** mechanism of action.

2. Materials and methods

2.1. Physical measurement

Commercially available reagents were purchased from Aldrich[®] and used without further purification. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained by using a Mercury Spectra AC 200 (200 MHz for ¹H and 50.3 MHz for ¹³C) in CDCl₃. Chromatography was made on silica gel purchased from Merck (silica gel 60, 0.063–0.200 mm). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was carried out using 0.2 mm commercial silica gel plates (silica gel 60 with fluorescent indicator UV₂₅₄). The purity is also determined by chromatography using a RESTEK Rtx[®]-35MS capillary column (30 m, 0.25 mmID, 0.25 μm df) in a CG-MS/2010 (Shimadzu) equipment. Mass spectra were determined either by electronic impact (EI, 70 eV). The IR spectrum was obtained using spectrophotometer FT-IR Prestige-21 (Shimadzu). The compound **3** have been already synthesized in our previous work (75% yield, using solvent and at room temperature) [15] and characterized from NMR by comparison with the compound described in literature [20].

2.2. Improvement of the synthesis of **3**

The chemical synthesis of **3** was performed through the Morita–Baylis–Hillman between the *p*-nitrobenzaldehyde (**4**) and acrylonitrile (**5**) in excess (Fig. 2), without use of solvents, at 0 °C with 100% yield. After a simple filtration the product was ready for the biological assays, which reiterates its easy handling in industrial scales.

The reaction was carried out using *p*-nitrobenzaldehyde (**4**) (1 mmol), 0.4 mL of acrylonitrile (**5**) (6 mmol) and 1 mmol of DABCO at 0 °C for 10 min. After the end of the reaction, the reaction media was directly filtered on silica gel, using AcOEt–Hexane (2:8) as solvent and the reaction product was concentrated under

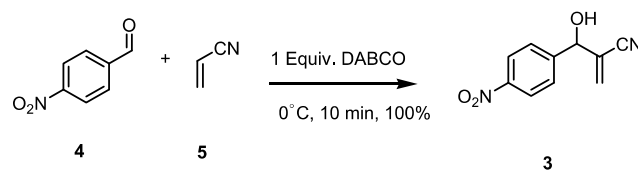


Fig. 2. Schematic representation **3** chemical synthesis (**4**) benzaldehyde and (**5**) acrylonitrile.

reduced pressure (100% yield, Fig. 2). In this new procedure, the product **3** was ready to be bioevaluated without further purification.

2.2.1. 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile (**3**)

IR (KBr): 3447, 3115, 2228, 1599, 1520, 1348, 736 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H); 6.07 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H); 6.16 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H); 5.42 (s, 1H); 3.23 (brs, 1H, CHOH). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 73.01; 116.62; 123.92(2C); 126.13; 127.34(2C); 130.51; 146.80; 147.82. C.G.: RT = 18.410 min (100%), injection temperature = 240 °C, injection mode = split, total flow = 50 mL/min, column flow = 1.13 mL/min, O.T.P. = rate 10.00 °C/min (100–280 °C); MS: *m/e*: 152 (M⁺–CH₂=CH₂CN, 100%).

2.3. *In vitro* studies

2.3.1. Parasites

Cultures of epimastigote forms of *T. cruzi*, Dm28c clone were maintained by weekly passages at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964), supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS). Three-day-old culture forms were used in the experiments. Bloodstream trypomastigotes Y strain were obtained by cardiac puncture of infected Swiss albino mice, at the peak of parasitaemia (7 days post-infection). All experiments involving the use of experimental animals were performed in accordance to ethical standards of Fundação Oswaldo Cruz and were approved by ethics committee (CEUA- FIOCRUZ L-0001/08).

2.3.2. Bioactivity assay

Compound **3** (Fig. 1) was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 50 μg/mL. This solution was then further dissolved in culture medium to obtain a stock solution at 1 mg/mL. Under these conditions, the DMSO was diluted at 2%. Both solutions were stored at –20 °C. The stock solution was then diluted in medium at 3.1–25 μg/mL so that the final concentration of DMSO never exceeded 0.05%, a nontoxic concentration to parasites. Epimastigotes (10⁶ parasites/mL) in the log phase of growth were incubated at 26 °C in LIT (liver infusion tryptose) medium supplemented with 10% FBS in the absence or presence of the different concentrations (3.1–25 μg/mL) of **3**. The inhibitory effect on cell growth was then estimated by cell counting using a Neubauer chamber. Bloodstream trypomastigote were resuspended to 2 × 10⁶ in RPMI plus 10% of FBS. This suspension (100 μL) was added to the same volume of **3**, previously prepared at twice the desired final concentrations. The incubation was performed in 96 well microplates at 37 °C for 24 h. The concentration that inhibited epimastigote growth by 50% (IC₅₀) and caused lysis of 50% of bloodstream trypomastigotes (IL₅₀) was determined by regression analysis using the program SPSS 8.0 for window after 72 h and 24 h of incubation respectively. All countings were performed in triplicate, in three independent experiments.

2.3.3. Ultrastructural assay

Epimastigote was incubated with corresponding IC_{50} or $2 \times IC_{50}$ and bloodstream trypomastigote forms were incubated with $2 \times IL_{50}$ and then processed for ultrastructural analysis. The parasites were fixed for 2 h at 4 °C in a solution containing 2.5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. After washing in the same buffer, the cells were post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide/5 mM $CaCl_2$ in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.2. They were then dehydrated in graded acetone series and embedded for 72 h at 60 °C in PolyBed 812 resin (PolySciences, Warrington, PA, USA). Ultrathin sections were stained with 5% uranyl acetate and lead citrate and observed in a Zeiss EM109 transmission electron microscope (TEM).

2.4. Theoretical procedures

2.4.1. Molecular docking

The docking calculations were done on the Fujitsu Scigress Explorer V.7.7 platform [30], which uses the PMF force field [31] to find the best ligand pose into the binding site of TcFPPS enzyme [10]. A carbon skeleton was hand-drawn and used as a base moiety to create the structures of **3**, then we used the beautify feature of Scigress to automatically fill in the missing hydrogen atoms, determine hybridization to the atoms and standardize geometries. Even after these arrangements though, every atomic hybridization, bond and hydrogen was counted and matched against the structure at hand, in order to avoid any automatically misplaced object. Following the structure setup, single point calculations were performed

using the PM3 semiempirical method [32]. The purpose for this was to assign atomic charges for each ligand.

2.4.2. The genetic algorithm

The genetic algorithm [33] was set to a 1 kcal mol⁻¹ convergence, a 0.3 mutation rate, 5000 max generation, a seven elitism index, 0.8 crossover rate and a population size of 70 chromosomes. A number of max 300 iterations at a 0.06 rate each were set and the mean force potential of united atoms was chosen. The grid spacing was of 0.375 Å in a cubic box of 13 Å edges.

3. Results and discussion

Incubation of *T. cruzi* epimastigote forms caused a strong growth inhibition in dose and time-dependent way, with an $IC_{50}/72$ h of about 28.5 μM, reaching 100% of cell growth inhibition at 122, 4 μM. The treatment of bloodstream trypomastigote with the same compound induced intense lysis of parasites, with an $IC_{50}/24$ h value of 25.5 μM and 100% of lysis at 61 μM. The viability of treated and untreated parasites was analyzed daily by light microscopy. The treated parasites showed rounded shaped morphology with the appearance of large vacuole at nuclear region and decrease of flagellar motility (data not shown).

Epimastigote forms treated with corresponding IC_{50} or $2 \times IC_{50}$ value were also analyzed at the ultrastructural level. Control epimastigote (Fig. 3) has as main characteristics the elongated shape, a centrally located nucleus, anterior flagellum, a single large mitochondrion, which contain a large condensation of mitochondrial DNA, called kinetoplast, and reservosomes, a membrane bound

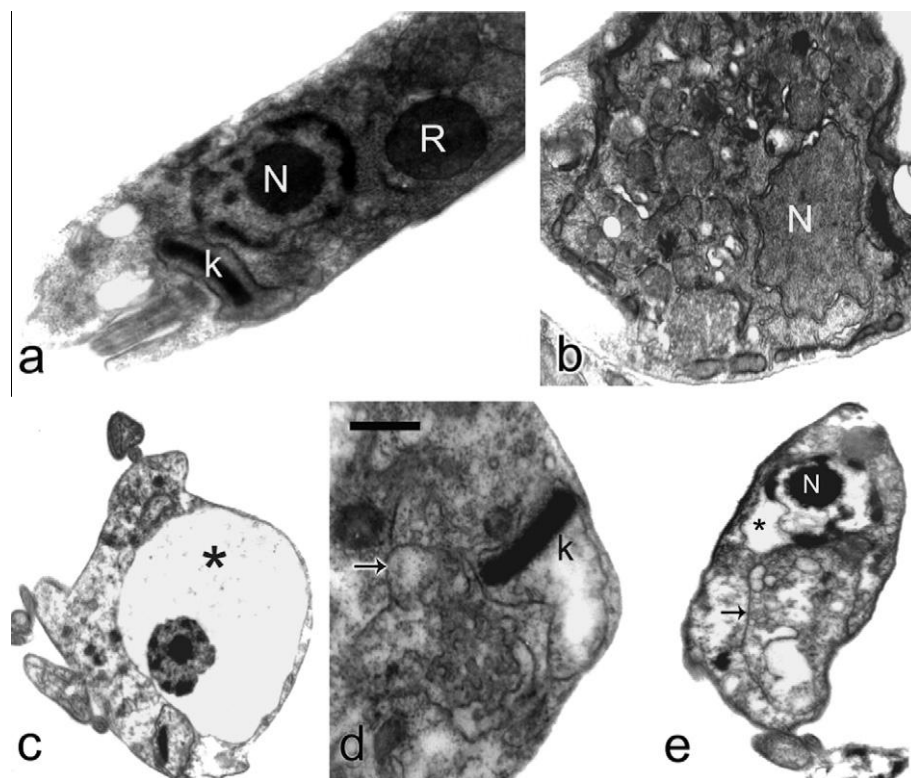


Fig. 3. Ultrastructural effects of **3** on *T. cruzi* epimastigote forms, as observed by TEM, after treatment with IC_{50} (b) or twice the corresponding IC_{50} value (c–e). (a) Untreated control epimastigote form displaying centrally located nucleus (N), the reservosomes at the posterior edge of the cell (R) and the kinetoplast (K). (b) Treated epimastigote presenting remarkable disorganization and the retraction of nuclear membrane. (c) Drastic affected cell presenting swelling of nuclear membrane with the appearance of large electron-lucent space between the nuclear monolayers, segregation of nuclear material, decrease of cytoplasm electron-density and loose of cell normal morphology. (d) Detail of reticulum profiles (arrow) surrounding the partially degraded organelle. Note the reduced electron-density and swelling of mitochondria close to the kinetoplast region. (e) Cell presenting condensation of chromatin, swelling of nuclear membrane and endoplasmic reticulum surrounding membranes and cytosolic structures. Bars 1 μm.

organelles which correspond to the pre-lysosomal compartments in this evolutive form. Treated epimastigotes presented several morphological changes including swelling and rounding of the parasite body and loss of internal organization, as compared with control cells (Fig. 3a–e). An interesting finding observed in most damaged cells was the swelling of nuclear envelope with appearance of a large electronlucent space between the lipidic monolayers and condensation of nuclear material, which becomes separated from nuclear membrane. (Fig. 3c). The autophagosomes which are characterized by the presence of the endoplasmic reticulum surrounding various organelles were frequently found in treated cells (Fig. 3d and e). Swelling of mitochondria with decrease of matrix electron density was eventually observed in some epimastigotes treated with twice the $IC_{50}/72$ h (Fig. 3d).

At ultrastructural level, untreated bloodstream trypomastigote forms presented elongated body, well preserved mitochondrion, homogeneous cytoplasm and a characteristic basket-shaped kinetoplast (Fig. 4a). Besides, the ultrastructural changes observed in treated-epimastigote forms, incubation of bloodstream trypomastigote with compound **3** lead to severe mitochondrial swelling with induction of intense k-DNA network disruption and eventually organelle fragmentation in the majority of cells treated with the drug (Fig. 4b). Morphological changes indicative of apoptotic process as chromatin condensation and rupture of nuclear membrane with loss of nuclear material were found in drastically damaged cell of both treated evolutive forms (Fig. 4e and c). Some cells presenting rupture of plasma membrane were also observed (Fig. 4b).

Our images obtained from the treatment of *T. cruzi* with **3** showed ultrastructural changes indicative of different cell-death pathways. Alterations such presence of endoplasmic reticulum surrounding cytoplasmic structures and autophagosome-like formations indicative of autophagy; chromatin condensation and loss of nuclear material indicative of apoptosis-like mechanisms; as well as plasma membrane rupture indicative of necrosis, were commonly observed in treated cells and have been reported in *Trypanosoma* and *Leishmania* species treated with several drugs [34,35]. In some cells, we found one or more phenotypes together, suggesting that compound **3** may be able to trigger different cell death mechanisms through distinct signaling pathway [36].

The results obtained by electron microscopy analysis point out the nucleus as the main target of compound **3** action in both parasite forms. Again, the trypomastigote forms were more sensitive to the treatment than epimastigote forms, presenting besides the nuclear alterations, profound changes in the kinetoplast network, as well as fragmentation of mitochondria and rupture of plasma membrane. The marked swelling of mitochondria and disruption of kinetoplast network predominantly found in trypomastigote

forms, suggesting that **3** probably affect the energy metabolism in the parasite. Furthermore, the lipophilic nature of this compound may alter the mitochondrial membrane permeability leading to the organelle collapse.

The morphological changes predominantly found in trypomastigote forms, suggests that compound **3** disturbs the integrity of organelles in at least two distinct mechanisms: The first proposed mechanism is based on the studies carried out by Tonin et al. [37] who have demonstrated that the redox potential of the nitro group has influence on the trypanocidal activity. The main intermediate products responsible for the cytotoxic action of the nitrocompounds are the nitro-radical anion (NO_2^-) and hydroxylamine derivative (R-NHOH), which are produced in the reduction of the nitro group similar way to the benznidazole derivatives mechanism [37]. Therefore, the nitro group in **3** might suffer reduction and oxidize cellular constituents. Indeed, Souza et al. [19] have demonstrated that the presence of *p*- NO_2 substituent in the **3** significantly increases the toxicity against both amastigote and promastigote forms of *L. amazonensis*. The damage caused by the reaction of reduced nitro radicals with cellular constituents might lead to the activation of cell-death pathways due to damage in DNA, membranes, lipids and proteins. The second proposed mechanism suggests that the **3** may act through the inhibition of the TcFPPS enzyme, which takes part in early catalytic steps of sterols biosynthesis pathway. Specific endogenous sterols have a remarkable part in growth and development of *T. cruzi* and *Leishmania* parasites because of their participation in post-translational regulation mechanisms, especially prenylation [38] (Perez-Salas et al.), which means that sterols biosynthesis inhibitors can be very potent anti-parasitic drugs [39,40]. Such data suggests that inhibition of TcFPPS depletes the parasite stocks of these essential endogenous steroids, inducing the parasite cell death throughout apoptosis, autophagy or necrosis which ultimately leads to the morphological changes seen in Figs. 4 and 5 such as nucleus swelling, mitochondrial fragmentation with profound changes in the kinetoplast network and rupture of plasma membrane.

A complement to the experimental studies presented here, we decided to carry out a theoretical molecular docking calculation of benznidazole (Rochegan®) (**1**), Risidronate (**2**) (Actonel®) and 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile (**3**) on TcFPPS. We have chosen compounds **1** and **2** (Fig. 2) as reference chemical structures to the molecular docking calculations. First, as the molecular mechanism of benznidazole (**1**) is not the inhibition of FPPS [4–6], a non-interaction between **1** and TcFPPS is expected in docking results, which would be a form of validation of our theoretical docking methodology. Compound **2** was also selected as standard chemical structure because of its elucidated role as an inhibitor of TcFPPS and its high efficacy which ranges in nM

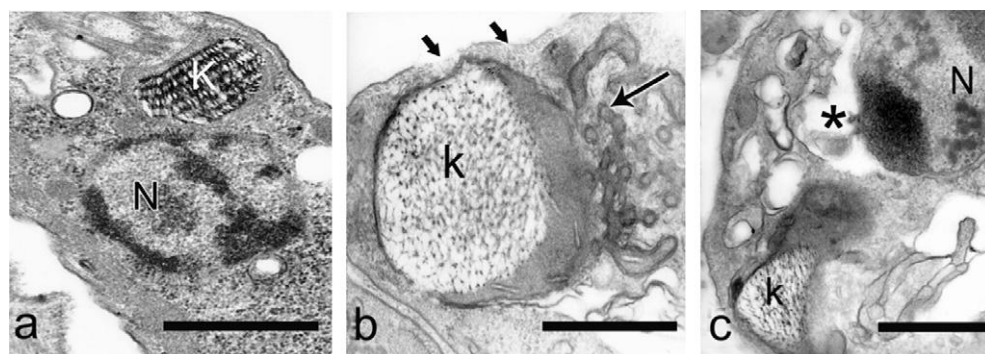


Fig. 4. Ultrastructural analysis of trypanomastigote of *T. cruzi* treated with **3** (a) Untreated trypanomastigote showing homogenous cytoplasm, a characteristic basket-like kinetoplast (K) and nucleus (N). (b) Compound **3** lead to swelling of mitochondria with fragmentation of organelle (long arrow), k-DNA network disruption and membrane rupture (short arrow). (c) Drastic affected cell showing swelling of nuclear membrane, disorganization of k-DNA network and cytoplasm vacuolation (V). Bars 1 μ m.

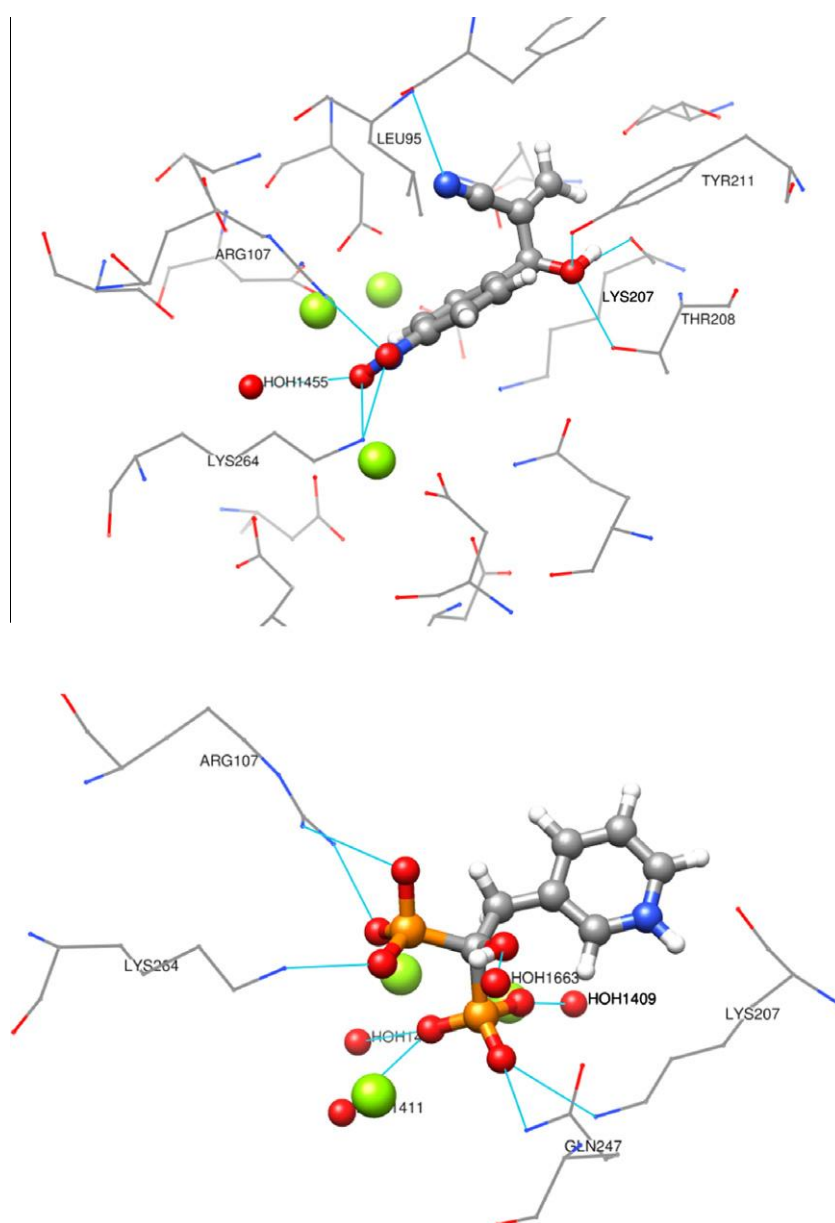


Fig. 5. (Downside) The best pose of RIS (**2**) redock in TcFPPS (in blue). The crystallographic geometry is represented in red and the active site in black. (Upside) Best pose of **3** in TcFPPS obtained by molecular docking. Hydrogen bonds are in cyan. The DMAPP residue was omitted to produce a better picture. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Ligand	PMF SCORE (kcal mol ⁻¹) ^a
1	+84.297
2	-119.142
3	-77.543

^a A negative value of PMF SCORE indicate a *in silico* inhibition of TsFPPS and a positive value of PMF SCORE indicate no inhibition TsFPPS enzyme.

scales [10] and, a high affinity of **2** by the TcFPPS is also a relevant point to validate our docking calculations. Besides, since this enzyme has already been isolated, crystallized and made available in PDB database (1YHL, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), it seemed a good starting point to perform molecular docking [41,42] in order to propose a molecular target for **3**. The docking

score of each one of the ligands **1**, **2** and **3** was then compared to one another. These results are shown in Table 1.

From the docking calculations results (Table 1) we notice that, in fact, Risidronate (**2**) is the most active molecule as a TcFPPS inhibitor, which is in agreement with its experimental nM efficacy scale [41,42]. Also as expected, the benzimidazole (**1**) score was very positive, which also agrees with experimental data pointing it does not work as a TcFPPS inhibitor [4–6]. These results validate our docking methodology. By this approach, the 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile) (**3**) showed a negative PMF score, suggesting that they may play, at least in part, a role as TcFPPS inhibitors, however in a lesser extend when compared with RIS (**2**) as expected (Table 1). The best poses of **2** and **3** in TcFPPS obtained by molecular docking are presented in Fig. 5.

We can see compound **3** has formed eight H-bonds. Four hydrogen bonds were identified at the nitro group: two with the side chain of ARG107, one with LYS264 and one with the crystal water

molecule HOH1455; three in the hydroxyl group: one with TYR211, one with ASP170 and one with the hydroxyl at THR208 and the last between the nitrile group and ASP98.

As for RIS (**2**), it was revealed that it forms nine hydrogen bonds with residues of the active site of TcFPPS. One at the hydroxyl group and the other eight at the phosphate groups (Fig. 5). Furthermore, distances comparable to coordination bonds were detected between **2** phosphate groups and the magnesium ions coordinated with TcFPPS active site aminoacids.

In conclusion, we envisioned that the molecule **3**, might have an enormous potential as drug candidate in the Chagas disease treatment. This statement is supported primarily by the expected simplicity and efficiency associated with its synthesis (having functional groups as diverse as a double bond, a nitro group, a hydroxyl group, and an aryl group). It is also important to emphasize that compound **3** was easily prepared at one-pot reaction, in 10 min and obtained in 100% yield. After a simple filtration the product was ready for the biological assays, which reiterates its easy handling in industrial scale. On the other hand, our data has shown that **3** was active against *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigote forms, exhibiting a remarkable *in vitro* trypanocidal activity at a μM scale.

Acknowledgments

This work has been supported by CNPq, CAPES, FAPESQ-PB, FIOCRUZ. The authors thanks Mr. Raimundo Nazareno C. Pimentel for technical assistance. Molecular graphics images were produced using the UCSF Chimera package from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR-01081).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bioorg.2010.06.003.

References

- [1] <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>> (accessed 10.01.10).
- [2] J.R. Coura, S.L. de Castro, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 (2002) 3–24.
- [3] A. Prata, Lancet Infect. Dis. 1 (2001) 92–100.
- [4] E. G.D. de Toranzo, J.A. Castro, B.M. Franke de Cazzullo, J.J. Cazzullo, Experientia 44 (1998) 880.
- [5] R. Do Campo, Chem. Biol. Interact. 73 (1990) 1.
- [6] E. Piaggio, J. Sancéau, S. Revelli, O. Bottasso, J. Wietzerbin, E. Serra, J. Immunol. 167 (2001) 3422–3426.
- [7] R. Viotti, C. Vigliano, B. Lecoco, M.G. Alvarez, M. Petti, G. Bertocchi, A. Armenti, Expert Rev. Anti Infect. Ther. 7 (2009) 157–163.
- [8] S.L. Croft, Parasite 15 (2008) 522–527.
- [9] J.A. Urbina, R. do Campo, Trends Parasitol. 9 (2003) 495–501.
- [10] S.B. Gabelli, J.S. McLellan, A. Montalvetti, E. Oldefield, R. Docampo, L.M. Amzel, Proteins: Struct. Funct. Bioinf. (2006) 62 80–88.
- [11] J.M.J. Rogers, S. Gordon, H.L. Belford, F.P. Coxon, S.P. Luckman, J. Monkkonen, J.C. Frith, Cancer 88 (2000) 2961–2978.
- [12] E. Dunfort, K. Thomsson, F.P. Coxon, F.P. Lucman, F.M. Hahn, C.D. Poulter, F.H. Ebetino, M.J. Roger, J. Pharmacol. Exp. Ther. 296 (2001) 235–242.
- [13] D. Basavaiah, J. Rao, T. Satyanarayana, Chem. Rev. 103 (2003) 811–891.
- [14] A.B. Baylis, M.E.D. Hillman, German Patent 2155113, Chemical Abstracts, vol. 77, 1972, p. 34174q.
- [15] R.O.M.A. de Souza, M.L.A.A. Vasconcellos, Syn. Commun. 33 (2003) 1383–1399.
- [16] M.K. Kundu, N. Sundar, S.K. Kumar, S.V. Bhat, S.V.N. Biswas, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 (1999) 731–736.
- [17] M.L.A.A. Vasconcellos, T.M.S. Silva, C.A. Camara, R.M. Martins, K.M. Lacerda, H.M. Lopes, V.L.P. Pereira, R.O.M.A. de Souza, L.T.C. Crespo, Pest Manage. Sci. 62 (2006) 288–296.
- [18] L.K. Kohn, C.H. Pavam, D. Veronense, F. Coelho, J.E. De Carvalho, W.P. Almeida, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 738–744.
- [19] M.L.A.A. Vasconcellos, R.O.M.A. de Souza, V.L.P. Pereira, B. Rossi-Bergmann, M.F. Muzitano, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 99–102.
- [20] T.C. Barbosa, C.G. Lima Junior, F.P.L. Silva, H.M. Lopes, L.R.F. Figueiredo, S.C.O. Souza, G.N. Batista, T.G. Silva, T.M. Silva, M.R. Oliveira, M.L.A.A. Vasconcellos, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1726–1730.
- [21] L.S. Miranda, M.L.A.A. Vasconcellos, Synthesis (2004) 1767–1770.
- [22] L.S.M. Miranda, B.G. Marinho, S.G. Leitão, E.M. Matheus, P.D. Fernandes, M.L.A.A. Vasconcellos, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 1573–1575.
- [23] L.S.M. Miranda, B.A. Meireles, J.S. Costa, V.L.P. Pereira, M.L.A.A. Vasconcellos, Synlett (2005) 869–871.
- [24] R.O.M.A. de Souza, B.A. Meireles, L.S. Sequeira, M.L.A.A. Vasconcellos, Synthesis (2004) 1595–1600.
- [25] U.F.L. Filho, S. Pinheiro, M.L.A.A. Vasconcellos, P.R.R. Costa, Tetrahedron Asymmetry 5 (1994) 1219–1220.
- [26] R.O.M.A. de Souza, A.L.F. Souza, T.L. Fernandez, A.C. Silva, V.L.P. Pereira, P.M. Esteves, M.L.A.A. Vasconcellos, O.A.C. Antunes, Lett. Org. Chem. 5 (2008) 379–382.
- [27] R.O.M.A. de Souza, V.L.P. Pereira, P.M. Esteves, M.L.A.A. Vasconcellos, Tetrahedron Lett. 49 (2008) 5902–5905.
- [28] R.O.M.A. de Souza, M.L.A.A. Vasconcellos, Catal. Commun. 5 (2004) 21–24.
- [29] E.B.A. Filho, E. Ventura, S.A. do Monte, B.G. Oliveira, C.G.L. Junior, G.B. Rocha, M.L.A.A. Vasconcellos, Chem. Phys. Lett. 449 (2007) 336–340.
- [30] Scigress Explorer v.7.7, Fujitsu, Tokyo, Japan, 2008.
- [31] I. Muegge, Y. Martin, J. Med. Chem. 42 (1999) 791–804.
- [32] J.J.P. Stewart, J. Comput. Chem. 10 (1989) 209.
- [33] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, J. Comput. Chem. 19 (1998) 1639–1662.
- [34] R.F. Menna-Barreto, G.A. Laranja, M.C. Silva, M.G. Coelho, M.C. Paes, M.M. Oliveira, S.L. de Castro, Parasitol. Res. 103 (2008) 111–117.
- [35] N.K. Verma, G. Singh, C.S. Dey, Exp. Parasitol. 116 (2007) 1–13.
- [36] R.F. Menna-Barreto, K. Salomão, A.P. Dantas, R.M. Santa-Rita, M.J. Soares, H.S. Barbosa, S.L. de Castro, Micron 40 (2009) 157–168.
- [37] L.T.D. Tonin, V.A. Barbosa, C.C. Bocca, E.R.F. Ramos, C.V. Nakamura, W.F. da Costa, E.A. Basso, T.U. Nakamura, N.H. Sarraggiotto, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1745–1750.
- [38] D. Perez-Sala, Front. Biosci. 12 (2007) 4456–4472.
- [39] J.A. Urbina, J.L. Concepcion, S. Rangel, G. Visbal, R. Lira, Mol. Biochem. Parasitol. 125 (2002) 35–45.
- [40] J.A. Urbina, Parasitology 114 (1997) S91–S99.
- [41] M. Prasenjit, V. D Prashant, S. Anuradha, B.L. Tekwani, M.A. Avery, J. Chem. Inf. Model. 48 (2008) 1026–1040.
- [42] J. Mao, S. Mukherjee, Y. Zhang, R. Cao, J.M. Sanders, Y. Song, Y. Zhang, G.A. Meints, Y. G. Gao, D. Mukkamala, M.P. Hudock, E. Oldfield, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 14485–14497.

4.2 Artigo 2: Cell death induced by 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile) in *Trypanosoma cruzi*.

O manuscrito será submetido à revista “Journal of Histochemistry and Cytochemistry” e está formatado conforme suas regras, exceto as figuras e tabelas, que foram inseridas no texto para facilitar a compreensão dos leitores. Neste artigo, utilizamos principalmente a microscopia confocal a laser e a citometria de fluxo para tentar discriminar os diferentes fenótipos de morte celular programada induzida pelo MBHA 3 em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

**Cell death induced by 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile) in
*Trypanosoma cruzi***

Jana M. Sandes^a, Mário A. A. Vasconcellos^b, Regina C. B.Q. Figueiredo^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil;

^b LASOM-PB, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil

Address to correspondence

Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo

Departamento de Microbiologia

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n – Campus da UFPE

Cidade Universitária

Recife, Pernambuco

51670420

Brazil

+558121012556

bressan@cpqam.fiocruz.br

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi*, is a serious health concern due to inexistence of effective vaccines or a safe treatment. In a search of a new compound against this neglected disease, we have previously demonstrated that the compound 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile) (MBHA 3), derived from Morita-Baylis-Hillman reaction, effectively inhibited epimastigote growth and caused loss of trypomastigote viability. However, the mechanism of cell death elicited by MBHA 3 treatment remains unknown. The aim of this study was to better characterize the morphophysiological changes and the mechanism of cell death induced by this compound on epimastigote form of *T. cruzi*. To perform this analysis, we used the combination of confocal microscopy and flow cytometry allied to fluorescent probes such as Annexin-V (AV) combined to Propidium Iodide (PI), Calcein-AM (CA) combined to ethidium homodimer (EH), Acridine orange (AO) and Rhodamine 123. At lower concentrations, the MBHA 3 treatment showed a high percentage of viable cells by CA/ EH assay, but also induced mitochondrial alterations and an increase of AO labeling. On the other hand, at 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the compound led to loss of cell viability with an extensive damage on plasma and mitochondrion membrane, DNA fragmentation and acidification of cytoplasm. In conclusion our finds suggested that MBHA 3, at higher concentration, induces *Trypanosoma cruzi* cell death by necrosis.

INTRODUCTION

Programmed cell death (PCD) is a genetically regulated active process of cell suicide that plays a central role in development and homeostasis of multicellular organisms, being also associated with a wide variety of human diseases, including immunological and developmental disorders, neurodegeneration, and cancer. The ways by which cells die involve three major mechanisms: apoptosis, autophagy and necrosis (Guimarães; Linden 2004).

Apoptosis is an orchestrated process that occur either in normal or pathological conditions. The morphological hallmarks of apoptosis include chromatin condensation and nuclear fragmentation which are usually followed by round up of cells. Finally, apoptotic cells give rise to small round bodies that are surrounded by membrane and contain intact organelle and nuclear fragments (Galluzi et al., 2007). Beside morphological changes three main biochemical events can be observed in cells undergo apoptosis 1) caspase activation; 2) DNA and protein breakdown and 3) phosphatidylserine exposition in the outer layer of cell membrane (Wong, 2011).

Autophagy is the main mechanism for proteins and organelles degradation (Alvarez et al., 2007). However, under some conditions the cells can be subjected to death through an exacerbated autophagic response (Ricci, Zong, 2006). The observation of autophagy by transmission electron microscopy usually involves membranes formation around cytoplasmic organelles and structures with their subsequent degradation, without an inflammatory response (Uchiyama et al., 2008).

Necrosis is usually referred as a process of cell collapse that involves gain in cell volume (oncosis) that ultimately lead to plasma membrane rupture, and the unorganized dismantling of swollen organelles (Kroemer et al., 2009). Apart from the presence of plasma membrane permeabilization necrosis lacks specific biochemical marks.

Essential features of PCD appear to be conserved in nematodes (*Caenorhabditis elegans*) (Erdélyi et al., 2011; Wu et al., 2012), insects (*Drosophila melanogaster*) (Cormier et al., 2012; Pritchett; McCall, 2012) and vertebrates (mammals), in terms of the genes encoding the basic cell death machinery and the morphological and biochemical characteristics (Arnoult et al., 2002). In addition to multicellular organisms, it has been demonstrated that various stimuli including drugs, oxidative stress, starvation, exposure to human serum, inhibition of signaling molecules, etc, are able to elicit PCD response in an increasing number of unicellular eukaryotic species (Bruchhaus et al., 2007), including kinetoplastid parasites of the genera *Leishmania* (Khademvatan et al., 2011; Marinho et al., 2011) and *Trypanosoma* (Sandes et al., 2010; Smirlis; Soteriadou, 2011)

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, one of the most serious infectious disease of humans. Despite the high toxicity of the drugs used, nifurtimox and benznidazole are the only available treatment. Although being effective in acute infections, their efficacy in chronic phase of disease is still controversial and no consensus about the evaluation of parasitological cure could be achieved (Salomon, 2011). In this sense, the development of more effective drugs, without significant side effects and with low cost associated is still needed.

In a search for compounds against Chagas disease we have previously demonstrated that incubation of parasites with MBHA 3 (Fig.1) had profound effects on epimastigotes growth and cause loss of trypomastigote viability (Sandes et al., 2010). Ultrastructural analysis of treated parasites revealed morphological characteristics of PCD. Although electron microscopy has proven to be useful to identify target organelles of drugs for Chagas disease and it has also been used to determine PCD phenotypes (Menna-Barreto et al., 2009), in the case of MBHA 3-induced cell death, this tool was not sufficiently robust to unequivocally discriminate between different phenotypes of PCD (Sandes et al., 2010). So in this work we

use the combination of confocal microscopy and flow cytometry allied to fluorescent probes to examine the mechanisms involved in cell death of *T. cruzi* induced by MBHA 3. Understanding the mechanism involved in drug-induced cell death of parasite may not only give insights into the pathogenesis of Chagas disease as well as help to better develop therapies against this illness.

MATERIALS AND METHODS

Drug - MBHA 3 compound (Fig.1) was synthesized and characterized as previously described (Sandes et al., 2010). The drug was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 50 mg/mL. This solution was then further dissolved in culture medium to obtain a stock solution at 1 mg/mL (stock solution). The stock solution was diluted again at concentrations of 6.0, 12.0 and 24.0 $\mu\text{g/mL}$ which correspond to previously determined IC_{50} , $2 \times \text{IC}_{50}$ and $4 \times \text{IC}_{50}$ after 72 hours of treatment respectively (Sandes et al., 2010). Throughout the experimental procedures the concentration of DMSO never exceeded 0.05%, which is not toxic to the protozoa.

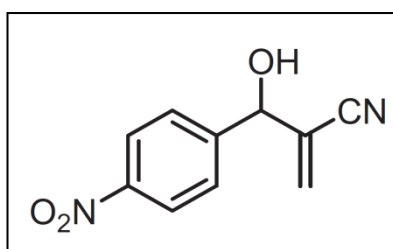


Fig. 1 Chemical structure of MBHA 3

Parasites - All experiments were carried out using *T. cruzi* epimastigote forms (Dm28c) from axenic cultures, maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% FBS at 28 °C and harvested during the exponential phase of growth.

Annexin V and Propidium Iodide labeling - Parasites, treated with different concentrations of the drug after 24, 48, and 72 h or control (untreated), were incubated with 5 $\mu\text{g/ml}$ annexin-V-FITC (AV) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) plus 10 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in an annexin-V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) for 15 min at 28 °C. After 15 min of loading, cells were directly

observed at confocal laser scanning microscopy (CLSM) or flow cytometry. Both probes were excited with 488 nm laser line and the emission recorded at 510 and 560 nm for AV and PI respectively.

Live/Dead assay - Cell viability was assessed by Calcein-AM (CA) which labels the cytoplasm of eukaryotic live cells, and ethidium homodimer (EH), which labels the nucleus in the cells whose plasma membrane integrity has been lost. Control and MBHA 3 treated parasites were harvested by centrifugation after 72 hours of incubation and resuspended in 0.5 ml PBS. 0.1 μ M of Calcein (Invitrogen) and 8 μ M of ethidium homodimer (Invitrogen) were then added to the parasite suspension. Samples were incubated for 30 minutes at room temperature and immediately analyzed by flow cytometry with a 530/30 filter (calcein) and 670 long pass filter (ethidium homodimer). For confocal microscopy 4 μ M of Calcein + 4 μ M of ethidium homodimer were used. Cells were observed with 488nm laser and images were acquired in 510 and 640 nm channels for CA and EH, respectively. Cells incubated with 4mM of H₂O₂ were used as positive control of cell death.

Acridine orange and Rhodamine 123 assay - treated and non-treated parasites were washed and resuspended in 0.5 ml PBS with 10 μ g/ mL Rhodamine 123 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) or 10 μ g/ mL acridine orange for 20 minutes. After loading time, the parasites were washed in PBS and analyzed by flow cytometry. A total of 20,000 events were acquired in the region previously established. Alterations in the fluorescence for Rh123 or AO were quantified by the index of variation (IV) obtained by the equation $(TM - CM)/CM$, where TM is the median of fluorescence for treated parasites and CM is that of the control. AO-labelled parasites were also observed at CSLM using 488 and 543 nm lasers.

DNA fragmentation - After 72 hours of incubation with MBHA 3 treated and untreated parasites were harvested by centrifugation and cell pellet containing 10^7 epimastigotes were treated with sarkosyl detergent lysis buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% w/v sodium-N-lauryl sarcosine, pH 7.5) and digested with proteinase K (20 mg ml⁻¹) 2h at 50°C. RNase A (0.3 mg ml⁻¹) treatment was given for 1 hour at 37°C. The lysates were then extracted with phenol/chloroform (25:24) and centrifuged at 16,000g for 5 min. The upper phase was treated overnight with 3 M sodium acetate and 100% ethanol at -20°C. The samples were centrifuged at 16,000 g for 10 minutes, the supernatant removed and 0.5 ml of 70% ethanol added. DNA was solubilized in Tris/EDTA (10 mM/1 mM) buffer, then mixed with tracking dye and loaded on 1% agarose gels containing ethidium bromide. Gels were submitted on eletroforese for 2.5 hours at 50 V.

RESULTS

Annexin V and Propidium Iodide assay

Annexin V is a Ca^{2+} dependent phospholipid-binding protein with high affinity for phosphatidylserine and it is usually used as an early marker for apoptosis whereas propidium iodide is a cell-impermeant dye and hence its red fluorescence is only detected in cells that have lost their membrane integrity (Tait, 2008). By using confocal microscopy, we showed that incubation of epimastigotes with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBHA 3 (IC_{50}) (Fig. 2B) does not yield substantial labeling for both markers as compared with control (Fig. 2A) and most of the cells was (AV-/PI-) after 72h of treatment. On the other hand, at drug concentration corresponding to 4x IC_{50} value we could observe, at any time of cultivation (data not shown), an increase of AV+/PI-, AV+/PI+ and AV-/PI+ phenotypes indicative of intense cell death (Fig. 2D). Most of cells positive for AV were also PI positive suggesting that apoptotic cells evolved into a secondary necrosis. Morphological changes characteristic of apoptosis as plasma membrane blebbing trapping nuclear material, was also observed in AV+/PI+ positive cells treated with 2x IC_{50} (Fig 2C, inset). A large number of cells undergoing necrosis cell death without translocation of phosphatidylserine (AV-/PI+) could also be observed mainly at 4 x IC_{50} (Fig. 2D).

Flow cytometry analysis corroborates the data obtained by confocal microscopy showing increased cell death in parasites treated with MBHA 3 with major differences detected in cells treated with 4x IC_{50} after 72 hours. Regardless the incubation time, at lower concentrations of drugs (1x and 2x IC_{50}), the percentage of non-apoptotic/intact cells (AV-/PI-) was always higher than 90%. Necrotic phenotypes (AV+/PI+ or AV-/PI+) was preponderant in cells treated with 4x IC_{50} corresponding to approximately 63% of cells treated after 72 h

post incubation, whereas only 8.84% of epimastigote population exposed phosphatidylserine at cell surface (AV+/PI-), at this concentration and incubation time (Table 1).

Table 1 Flow cytometry analysis of *T. cruzi* treated with 6, 12 and 24 $\mu\text{g/ mL}$ of MBHA 3 and labeled with Annexin V/propidium iodide.

hours	AV+/PI- (%)				AV-/PI+ (%)				AV+/PI+ (%)			
	$\mu\text{g/ mL}$				$\mu\text{g/ mL}$				$\mu\text{g/ mL}$			
	control	6	12	24	control	6	12	24	control	6	12	24
24	0.54	0.68	0.59	1.13	0.11	0.16	0.28	9.76	0.17	0.46	0.36	31.95
48	0.66	1.93	1.94	2.43	0.14	0.23	0.75	12.30	0.33	0.58	2.24	37.39
72	0.85	3.21	3.42	8.84	0.09	0.34	1.10	20.28	0.31	1.25	4.87	42.18

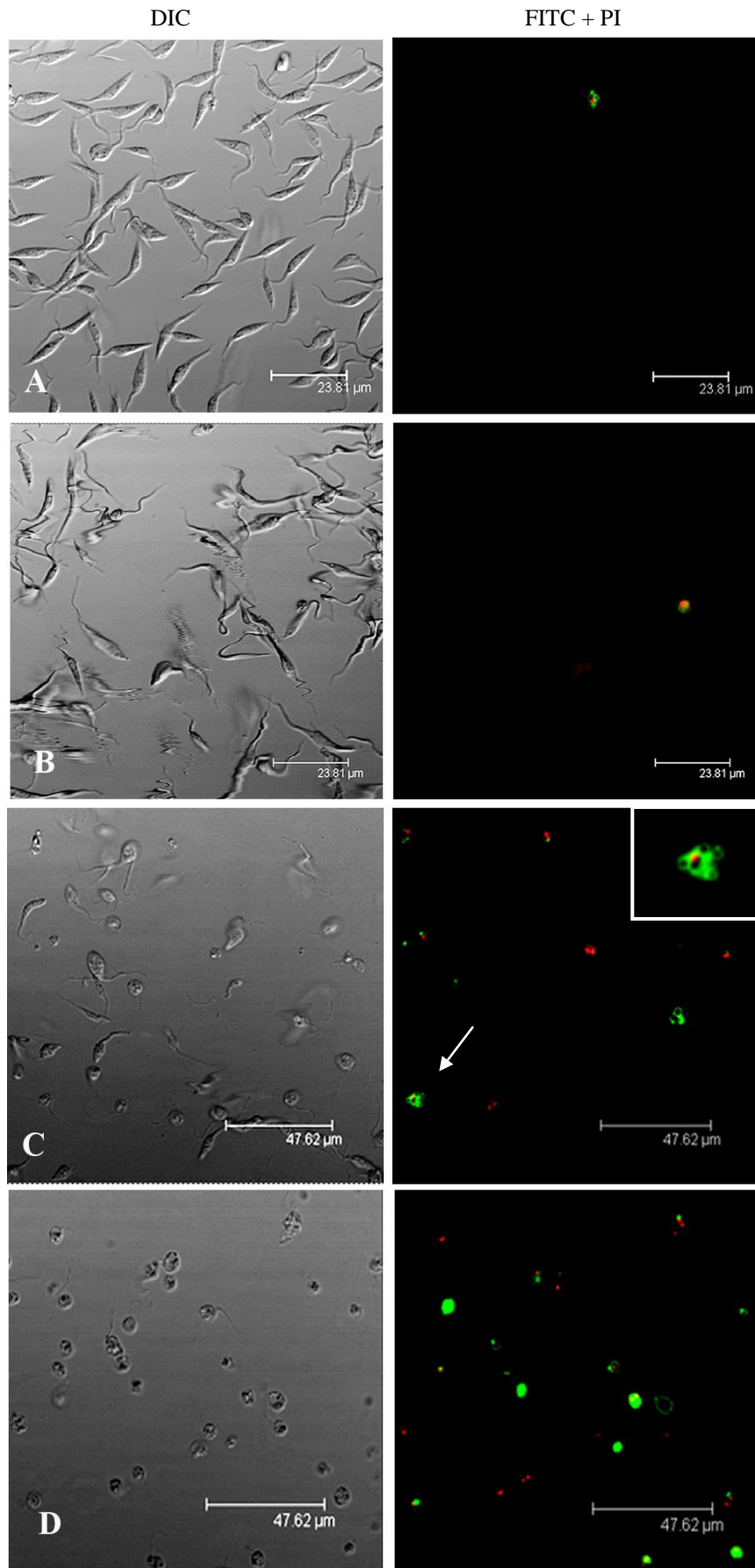


Fig. 2 Effects of MBHA 3 on Annexin V (green fluorescence) and Propidium Iodide (red fluorescence) labeling. (A) Control and treated (B - D) parasites after 72 hours of incubation. (B) 6 μ g/ mL, (C) 12 μ g/ mL and (D) 24 μ g/ mL. Note in C (white arrow) the presence of cell showing both membrane blebs, characteristic of apoptosis, and PI labeling in the parasite nucleus, characteristic of necrosis (inset).

Live/Dead assay

In attempt to clarify whether non-apoptotic/intact parasites presenting AV-/PI-phenotype, undoubtedly correspond to viable cells, we used Calcein-AM and ethidium homodimer-1 live/dead viability test. Membrane-permeant calcein AM is cleaved by esterases in live cells to yield cytoplasmic green fluorescence, and membrane-impermeant ethidium homodimer-1 labels nucleic acids of membrane-compromised cells with red fluorescence (Gatti et al., 1998). As expected the majority of untreated cells were CA positive, whereas few cells were stained with EH (CA+/EH-) (Fig. 3A). In these cells Calcein exhibit homogeneous bright green fluorescence along all the cytoplasm, nucleus and kinetoplast. No significant differences could be observed in the ratio of CA labeled-cells incubated with 1 x and 2x IC₅₀. However, in cells treated with 2xIC₅₀ CA labeling pattern was affected and a punctuated and heterogeneous labeling became evident, indicating gradual loss of esterase activity (Fig. 3C). A considerable decrease of CA labeling could be observed in cells treated with 4xIC₅₀ with an increasing in double positive cells (CA+/EH+) (Fig. 3D). The cytometry analysis showed that 14.43% and 23% of 1 x and 2x IC₅₀ treated cells, respectively, loosed their viability according to the percentage obtained from CA-/ EH- phenotype (Table 2). A high rate of cell death were observed in cells treated with 4xIC₅₀, with increased percentage of CA-/EH+ (67.4%) and CA+/ EH+ (21.27%) phenotypes.

Table 2 Percentage (%) of *T. cruzi* CA and/ or EH labeling by flow cytometry, after 72h of incubation.

CA-/ EH-				CA-/ EH+				CA+/ EH+			
Untreated	µg/ mL			Untreated	µg/ mL			Untreated	µg/ mL		
	6	12	24		6	12	24		6	12	24
0.40	14.43	23.00	5.72	0.14	0.23	1.52	67.40	2.56	2.50	2.24	21.27

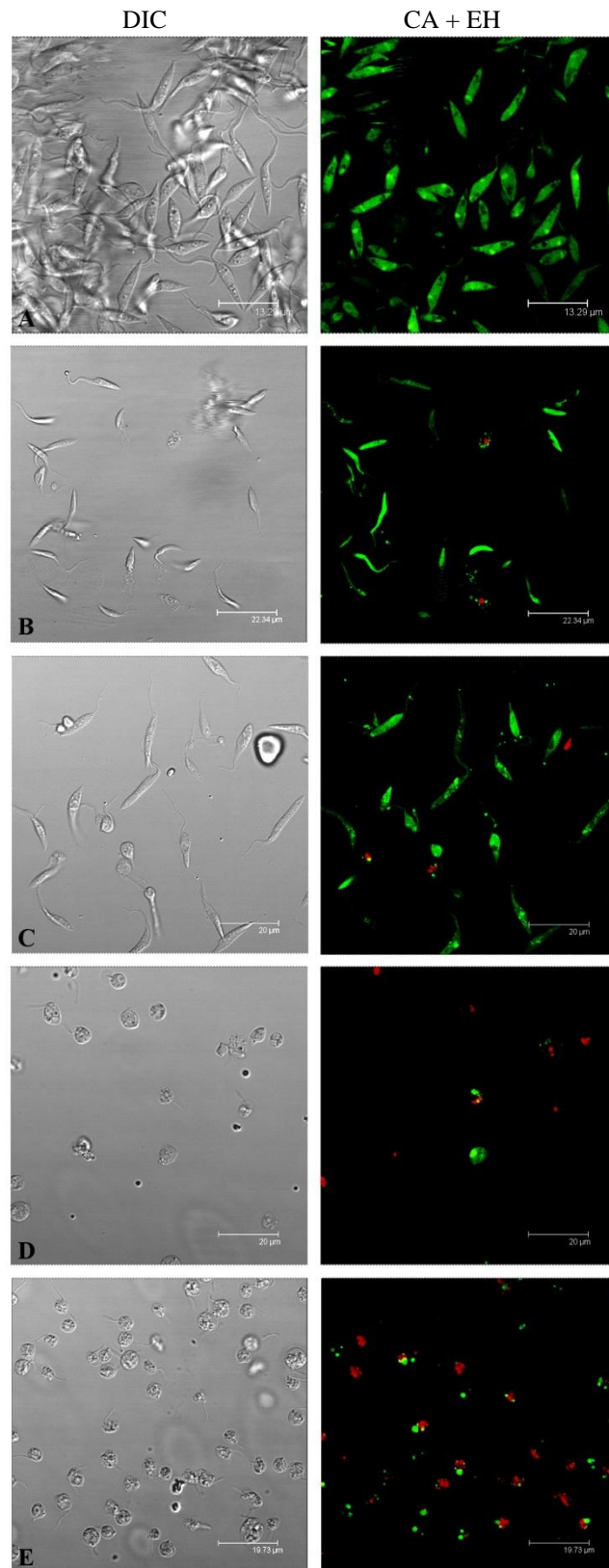


Fig. 3. Control (A) and MBHA3-treated at different concentrations of drug (B-D) for 72 h and labeled with CA and EH. (B) 6μg/ mL, (C) 12μg/ mL and (D) 24μg/ mL. Left column corresponding to DIC image and right one the corresponding merging of both marker. (E) Cells incubated with 4mM of H₂O₂ for 4 h and used as positive control of cell death.

Acridine orange assay

Acridine orange (AO) is a fluorescent dye that enters the cells and become trapped in acidic vesicular organelles (AVO) such as lysosomes and autophagosomes. For this reason AO has been used as a marker of autophagy (Monte-Neto et al., 2011). AO also intercalates into DNA rendering a bright green fluorescence thus allowing monitoring cellular physiological changes associated with nuclear changes during PCD (Nishikawa et al., 2010). Under confocal microscopy control cells stained with AO presented a well preserved morphology with bright green fluorescence labeling in the nucleus and kinetoplast and a pale green fluorescence in the cytoplasm (Fig. 4A). Red fluorescence was detected mainly within large organelles located at the posterior end of cells, which correspond to reservosome, a pre-lysosomal compartment in epimastigote forms. Small red vesicles were observed randomly distributed throughout the cytoplasm. In IC_{50} -treated cells we observed a discrete increase in the number of red-labeled compartments, and few cells have already presented nuclear pyknosis (Fig. 4B). Treatment with $2x IC_{50}$ of MBHA 3 caused a decrease in green fluorescence and acidification of cytoplasm (Fig. 4C). The effects of drug on parasite nucleus were more pronounced with intense nuclear pyknosis and karyorrhexis (Fig. 4C, inset). The positive IV values of AO in the red channel (table 3) found in cells treated with $1x IC_{50}$, likely correspond to an increase in number of intracellular compartments and are consistent with our confocal microscopy findings. However, positive IV value at $2x IC_{50}$ might mean a decrease of cytoplasmic pH as observed by diffuse red labeling found in the cytoplasm of cells treated with MBHA 3 at this concentration (Fig. 4C). Both green and red fluorescence signal vanished in cells treated with $4x IC_{50}$ and a considerable swelling of parasites could be observed (Fig. 4D). In this condition, the IV value in red channel was -0.91 indicating a decrease of red fluorescence signal in these cells (table 3).

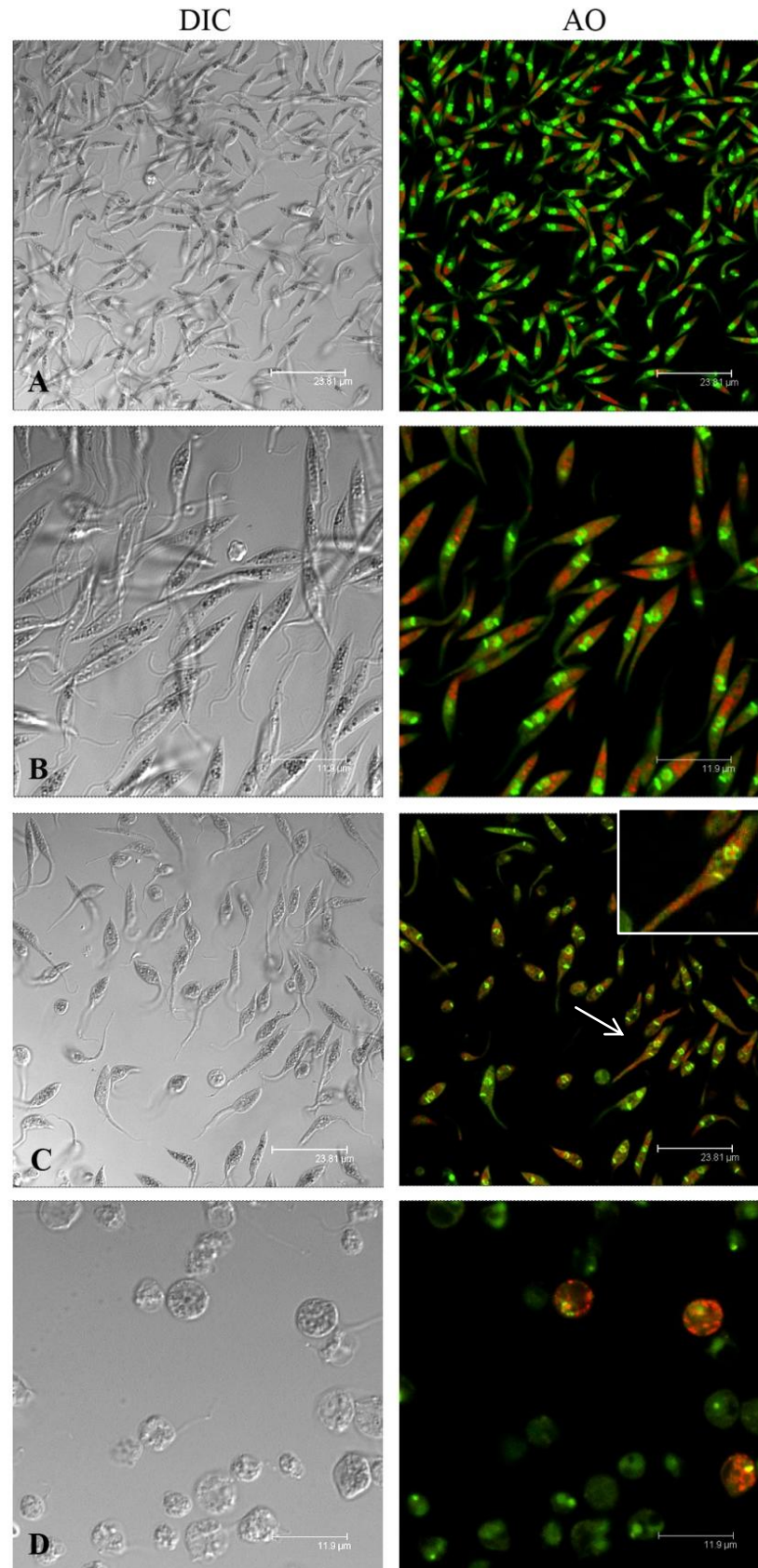


Fig. 4 AO labeling of untreated (A) or MBHA 3 treated (B-D) cells, for 72h. (B) 6 µg/ mL; (C) 12 µg/ mL; and (D) 24 µg/ mL. AO stains acidic compartment in red and cytoplasm, nucleus and kinetoplast in green. (C) Detail of AO-labelled cells showing pyknotic nucleus (inset).

Table 3 Index of variation of Rh 123 and AO fluorescence intensity on MBHA 3 treated cells by 72h.

	IV		
	6 µg/ mL	12 µg/ mL	24 µg/ mL
Rh 123	-0.02	-0.64	-0.87
AO	2.01	1.91	-0.91

Rhodamin 123 assay

In order to determine whether MBHA 3 -induced PCD of parasites is related to alteration of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), this parameter was analyzed by flow cytometry using Rhodamin 123 staining. Labelling of treated cells with Rho 123 showed a gradual depolarization of mitochondria as indicated by negative IV values (Table 3). However, at 6 µg/mL the IV value was -0.02, which means that the fluorescence intensity between treated cell and control cells was very similar.

DNA fragmentation assay

The results are depicted in Fig. 5. An increased DNA damage and fragmentation could be observed in cells treated with 2 xIC₅₀ (lane 3) and 4 xIC₅₀ (lane 4) or H₂O₂ (positive control of cell death) (lane 5). No DNA damage was observed at the lowest concentrations of drug (lane 2) and in control (lane 1).

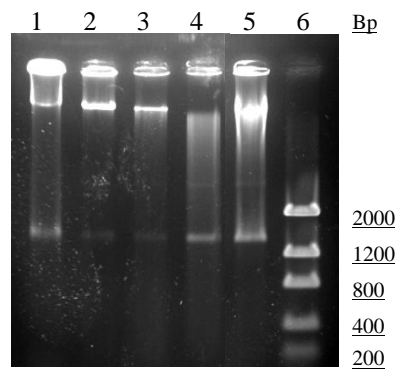


Fig. 5 Electrophoresis of total DNA from epimastigotes, untreated (lane 1), treated with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 2), 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 3) and 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 4) by 72h. 4h 4mM H_2O_2 (lane 5). Low DNA Mass Ladder (lane 6).

DISCUSSION

The problematic of Chagas disease, caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi*, remains a serious health concern due to inexistence of effective vaccines or treatment. Efforts to control this endemic illness are still based on therapeutic drugs which have serious side effects, high cost and low efficacy at the chronic phase of disease. In addition there is an increasing drug resistance and the cost of treatment is very expensive for most of people affected (WHO, 2010). Thus the search for new anti-parasitic agents for Chagas disease that have low toxicity for patients and low cost is still need (Soeiro; Castro, 2011).

Morita–Baylis–Hillman (MBH) reaction is an atom-efficient condensation methodology that provides easy access to highly functionalized carbonyl derivatives with low cost (Basavaiah et al., 2012). MBH adducts are extensively used in synthesis as versatile starting material for many natural products and drugs. Previous work carried out by our group showed that at low concentrations, compound 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile), derived from Morita-Baylis-Hillman reaction effectively inhibited epimastigote growth and led to a decrease in trypomastigotes viability. Ultrastructural analysis of treated-cells showed morphological characteristic of programmed cell death. However, the mechanism of cell death elicited by MBHA 3 treatment remain unknown (Sandes et al., 2010).

In this work we examined the effects of MBHA 3 on epimastigote form of *T. cruzi*, by using fluorescent marker of PCD in attempt to better characterize the morphophysiological changes and the mechanism of cell death induced by MBHA 3. Although there is a number of experimental evidences that the mechanism of cell death found in multicellular organisms is also present in unicellular organisms including trypanosomatids, evaluation of cell death in these parasites is still a complex work. For example, genes encoding caspases, death receptors, which are involved in cell death by apoptosis are absent in trypanosomatids (Lüder

et al., 2010). Thus, most of studies carried out on cell death in these parasites are still based on morphological parameters, mainly by transmission and scanning electron microscopy. Although these techniques can provide valuable clues of PCD in these parasites the possibility to follow this process by direct imaging of live cells is important to better understand the entire process in addition to strictly morphological study (Gatti et al., 1998).

Evaluation of apoptosis and necrosis by both fluorescence microscopy and flow cytometry is usually accomplished by combined use of annexin V-FITC, which access phosphatidylserine exposed on the external membrane at the beginning of this process and propidium iodide which allows to verify nuclear alterations in the late stages of apoptosis, as a consequence of the increase in membrane permeability (Kroemer et al., 2009). Our results showed that incubation of cells with MBHA 3 at concentration corresponding to once and twice the IC_{50} value do not yield significant loss in cell viability, although some morphological changes could be already identified. These results were confirmed by other parameters analyzed suggesting that at least at concentration corresponding to IC_{50} , MBHA 3 have a more cytostatic than cytotoxic effects. An interesting feature of treated cells was the high percentage of cells presenting AV⁺/PI⁺ phenotype in cells treated with 4 x IC_{50} . The apparent contradictory nature of this phenotype could be explained by the binding of annexin to internal phosphatidylserine residues after the membrane integrity have been lost. It is usually assumed that cells which are negative for Annexin and PI (AV⁻/PI⁻) correspond to viable cells. However, this statement should be considered carefully. It is possible that other cell death mechanism rather than apoptosis or necrosis is operating in AV⁻/PI⁻ cells. We further use Calcein AM/EH viability test to check whether AV⁻/PI⁻ indeed correspond to live cells. By this technique we found that the viability was considerably lower than those found by Annexin V-Propidium iodide assay. The differences found between these methodologies were more pronounced at 4 x IC_{50} concentration. Although both probes allowed the detection

of apoptotic and necrotic cells, annexin might be less effective than calcein for discriminate viable from unviable cells. Thus, the use of annexin V/iodide propidium alone could lead to overestimate the live cells in culture (Worthen et al., 2010).

Acridin orange is a nucleic acid selective fluorescent dye useful for cell cycle determination by combining with DNA emitting a green fluorescence. It also enters acidic vesicular organelles (AVOs), such as lysosomes becoming protonated and trapped in these compartments (Nishikawa et al., 2010). In low pH environment this dye emits red fluorescence. Thus, acridine orange has been used, among other applications, to monitor major morphological changes induced by different stimuli, as drug treatment (Monte-Neto et al., 2011). Herein, we have found an increased red fluorescence intensity in cell treated at low concentrations. In this condition, approximately 83% of cells were viable as showed by cytometry. The increasing number of acidic compartments observed in IC_{50} -treated cells can be due to an autophagic process in these cells. On the other hand, the diffuse red labeling observed throughout the cytoplasm in cells treated with $2x IC_{50}$ can be due to a deterioration of lysosomal membranes and acidification of cytoplasm leading to loss of cell viability as demonstrated by annexin and Calcein labeling. The considerable decrease in green fluorescence found in $4x IC_{50}$ can be due to the damage or conformational alteration in nucleic acids, impairing AO-DNA intercalation. Consistently, DNA fragmentation assay showed that MBHA-3 induced a nonspecific DNA degradation at higher concentrations, resulting in a 'smear' of randomly degraded DNA, an exclusively feature of necrosis (Galluzzi et al., 2009).

The mechanism of action by which MBHA 3 induces cell death is still unsolved but previous molecular docking analyses have pointed MBHA 3 as a putative inhibitor of parasite Farnesyl Pyrophosphate Synthase. Furthermore, it has been proposed that the nitro groups presented in MBHA 3 might undergo reduction leading to oxidation of cellular constituents as

nucleic acid and mitochondrion, which is highly dependent on oxi-reduction reactions (Sandes et al., 2010; Tonin et al., 2009, Souza et al, 2007). To test this hypothesis and investigate whether MBHA 3- induced apoptosis and necrosis of *T. cruzi* was related to alterations in parasite mitochondrion we used rhodamine 123 to detect changes in $\Delta\psi_m$. It has been shown that mitochondrion plays a pivotal role in cell live and death decisions (Lee; Thévenod, 2006). In normal cells the electrochemical gradient is maintained by active pumping of H⁺ during the transference of electron throughout the respiratory chain. In this sense, the transmembrane potential maintains the integrity and function of mitochondria. Perturbations in this potential could lead to decrease of ATP production, reduction of translation and transcription of mitochondrial genes, which ultimately result in apoptosis and/or necrosis (Shang et al., 2009). The negative IV values found in treated cells indicated a considerable loss of the membrane potential of mitochondria even at lower concentrations. This result showed that alteration in mitochondria potential induced by MBHA 3 treatment preceded the apoptosis and necrosis of *T. cruzi*. As mentioned before the nitro groups of MBHA 3 molecules can induce the production of free radicals and active oxygen species, thereby resulting in the decrease of mitochondrial potential and cell death by apoptosis and necrosis.

In conclusion our finds suggested that MBHA 3, at higher concentration, induces *Trypanosoma cruzi* cell death by necrosis in mitochondrion-dependent manner.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq, CPqAM-FIOCRUZ. We are thankful to Mrs. Cassia Docena, Mrs. Viviane Carvalho and Ms. Maria Carolina Accioly for technical assistance and the Program for Technical Development of Health Inputs (PDTIS)/FIOCRUZ for use of its facilities.

LITERATURE CITED

Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. 2002. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ.* 9(1):65-81.

Basavaiah D, Veeraraghavaiah G. 2012. The Baylis–Hillman reaction: a novel concept for creativity in chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 41, 68-78.

Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. 2007. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol.* 23(8):376-83.

Cormier O, Mohseni N, Voytyuk I, Reed BH. 2012. Autophagy can promote but is not required for epithelial cell extrusion in the amnioserosa of the *Drosophila* embryo. *Autophagy.* 8(2). In Press

Erdélyi P, Borsos E, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, Sengupta T, Dengg M, Pécsi I, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, Vellai T. 2011. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* 124(Pt 9):1510-8.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14(7):1237-43.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 16(8):1093-107.

Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. 1998. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J Histochem Cytochem.* 46(8):895-900.

Guimarães CA, Linden R. 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem.* 271(9):1638-50.

Khademvatan S, Gharavi MJ, Saki J. 2011. Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in *Leishmania infantum*. *Braz J Infect Dis.* 15(5):442-8.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.

Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16(1):3-11.

Lee WK, Thévenod F. 2006. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am J Physiol Cell Physiol.* 291(2):C195-202.

Lüder CG, Campos-Salinas J, Gonzalez-Rey E, van Zandbergen G. 2010. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasit Vectors.* 3:116.

Marinho Fde A, Gonçalves KC, de Oliveira SS, de Oliveira AC, Bellio M, d'Avila-Levy CM, dos Santos AL, Branquinha MH. 2011. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(4):507-9.

Menna-Barreto, R. F.; Salomão, K.; Dantas, A. P.; Santa-Rita, R. M.; Soares, M. J.; Barbosa, H. S.; De Castro, S. L. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron.* 40:157-168.

Monte Neto RL, Sousa LM, Dias CS, Barbosa Filho JM, Oliveira MR, Figueiredo RC. 2011. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Exp Parasitol.* 127(1):215-21.

Nishikawa, T., Tsuno, N.H., Okaji, Y., Shuno, Y., Sasaki, K., Hongo, K., Sunami, E., Kitayama, J., Takahashi, K., Nagawa, H., 2010. Inhibition of autophagy potentiates sulforaphane-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology* 17, 592–602.

Pritchett TL, McCall K. 2012. Role of the insulin/Tor signaling network in starvation-induced programmed cell death in *Drosophila* oogenesis. *Cell Death Differ.* In press.

Sandes JM, Borges AR, Junior CG, Silva FP, Carvalho GA, Rocha GB, Vasconcellos ML, Figueiredo RC. 2010. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* . *Bioorg Chem.* 38(5):190-5.

Salomon CJ. 2011. First century of chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci.* doi: 10.1002/jps.23010. In press.

Shang XJ, Yao G, Ge JP, Sun Y, Teng WH, Huang YF. 2009. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner. *J Androl.* Mar-30(2):122-6.

Smirlis D, Soteriadou K. 2011. Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence.* 2(3):253-6.

Soeiro, M. N.; Castro, S. L. de. 2011. Screening of Potential anti-*Trypanosoma cruzi* Candidates: In Vitro and In Vivo Studies. *Open Med. Chem. J.*, 5: 21-30.

Souza RO de, Pereira VL, Muzitano MF, Falcão CA, Rossi-Bergmann B, Filho EB, Vasconcellos ML. 2007. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)propanenitrile and analogous compounds. *Eur J Med Chem.* 42(1):99-102.

Tait JF. 2008. Imaging of apoptosis. *J Nucl Med.* 49:1573–1576.

Tonin LT, Barbosa VA, Bocca CC, Ramos ER, Nakamura CV, da Costa WF, Basso EA, Nakamura TU, Sarragiotto MH. 2009. Comparative study of the trypanocidal activity of the methyl 1-nitrophenyl-1,2,3,4-9H-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylate derivatives and benznidazole using theoretical calculations and cyclic voltammetry. *Eur J Med Chem.* 44(4):1745-50.

World Health Organization. 2007. WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. WHO Report, Geneva.

Worthen C, Jensen BC, Parsons M. 2010. Diverse effects on mitochondrial and nuclear functions elicited by drugs and genetic knockdowns in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(5):e678.

Wu YC, Wang X, Xue D. 2012. Methods for Studying Programmed Cell Death in *C. elegans*. *Methods Cell Biol.* 107:295-320.

6 DISCUSSÃO

Na prospecção de compostos com atividade tripanocida, nossos estudos apontaram o composto MBHA 3 como altamente promissor contra *Trypanosoma cruzi* (SANDES et al., 2010). Além de atuar em concentrações na faixa de μM , este composto apresenta várias vantagens, como a sua fácil síntese e baixo custo associado a sua produção (BASAVIAH et al., 2012). Estes últimos fatores são importantes, uma vez que a doença de Chagas é uma doença que atinge as populações mais desfavorecidas economicamente, sendo considerada pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2010) como uma doença altamente negligenciada.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o aduto MBHA 3 inibiu fortemente o crescimento de formas epimastigotas e levou a perda de viabilidade em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O sucesso *in vitro* de compostos derivados desta reação química contra o tripanosomatídeo *Leishmania amazonensis* foi demonstrado por Silva e colaboradores (2011). Estes autores analisaram a atividade biológica de dezesseis novos congêneres de adutos e analisaram a toxicidade destes compostos frente a macrófagos murinos. Os compostos 2-[Hidroxi(2-nitrofenil)propil] propanoato e 2-[Hidroxi(2-nitrophenil)hidroxietil] propanoato foram os mais efetivos contra formas promastigotas. Estes resultados comprovam que adutos de Baylis-Hillman, tais como o MBHA 3, além de possuírem atividade contra tripanosomatídeos parasitas também são estruturas bastante versáteis permitindo manipulações químicas que podem aumentar a atividade anti-parasitária e/ou diminuir a toxicidade para as células do hospedeiro (SILVA et al., 2011).

Para identificar possíveis alvos intracelulares da droga, um estudo através de microscopia eletrônica de transmissão foi realizado. Nossos resultados demonstraram que os parasitas tratados apresentaram drásticas alterações morfológicas, principalmente no núcleo celular, o qual apresentou retração da membrana e a presença de grande espaço elétronlúscido entre os dois folhetos, apontando esta estrutura como principal alvo intracelular da droga. Alterações sugestivas de perda de viabilidade compatíveis com fenótipos de morte celular tais como: condensação da cromatina, perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas e ruptura da membrana plasmática, as quais são as principais características morfológicas de morte celular por apoptose, autofagia e necrose respectivamente, foram observados na maioria dos parasitas tratados (SANDES et al., 2010). Além das alterações relatadas, formas tripomastigotas apresentaram comprometimento

mitocondrial sugerindo que o metabolismo desta organela é afetado pelo tratamento com a droga. O comprometimento adicional das mitocôndrias pode explicar o fato destas formas terem sido as mais susceptíveis à ação da droga do que as formas epimastigotas. Isso é bastante interessante sob o ponto de vista da patologia da doença, uma vez que os tripomastigotas são as formas infectivas presentes no hospedeiro vertebrado. No entanto, a resposta da forma amastigota intracelular frente a este composto ainda precisa ser avaliada.

A microscopia eletrônica tem sido um instrumento importante para elucidação dos mecanismos de ação de drogas contribuindo para o planejamento racional no desenvolvimento de novos fármacos contra as mais diferentes doenças (MENNA-BARRETO et al., 2009). No entanto, esta técnica requer a fixação dos espécimes e tratamento químico durante o preparo de amostras. Por essa razão a microscopia eletrônica pode apenas oferecer informações pontuais sobre fenômenos biológicos complexos como a MCP induzida por drogas. Além do mais, vários estudos têm demonstrado que as vias de morte celular se interconectam. Por exemplo, o stress nutricional pode levar as células à um processo de autofagia, caracterizado pela degradação e reciclagem de constituintes celulares, onde parte do citoplasma ou organelas inteiras são capturadas em vesículas de membrana dupla, denominadas autofagosomos, as quais se fundem com lisosomos permitindo a degradação das estruturas (ALVAREZ et al., 2007). Embora a autofagia possa servir como um mecanismo protetor contra agressões externas, pela reciclagem de macromoléculas e remoção de organelas não funcionais, uma resposta autofágica exacerbada pode resultar em morte celular por apoptose ou necrose (ZONG; THOMPSON, 2006). Tendo em vista que os processos que levam à morte celular são altamente dinâmicos com vários pontos de interconexão das suas principais vias, muitas vezes a avaliação deste processo por parâmetros meramente morfológicos podem gerar interpretações equivocadas, principalmente em células unicelulares como o *T. cruzi*, onde a presença destes eventos parece ser controversa sob o ponto de vista evolutivo (LÜDER et al., 2010).

O surgimento de instrumentos tais como a microscopia confocal a laser e a citometria de fluxo, aliados ao desenvolvimento de sondas fluorescentes, tem permitido acompanhar em tempo real fenômenos biológicos complexos, tais como morte celular, embriogênese e ciclo celular, com uma especificidade de marcação e qualidade de imagem que ultrapassam o limite de resolução dos microscópios ópticos convencionais (PADDOCK, 2000). A visualização direta pode ser crucial em culturas de células heterogêneas, onde apenas uma parte das células entra em apoptose ou quando é importante seguir no tempo processos que são variáveis, dependendo do tipo de célula e do estímulo empregado (GATTI et al., 1998). A importância

da análise baseada em múltiplos parâmetros deve ser reforçada nos estudos envolvendo a morte celular programada (KROEMER et al., 2009). Dessa forma, através de diferentes sondas específicas nós aprofundamos nossos estudos sobre os mecanismos de morte celular que possam explicar as alterações sofridas pelas células tratadas com o composto MBHA 3. Certamente, o conhecimento sobre este processo em protozoários parasitas não são apenas de importante interesse científico, mas podem abrir um campo amplo de investigação no desenvolvimento de novas terapias anti-parasitárias (LÜDER et al., 2010).

Inicialmente, utilizamos dois marcadores fluorescentes, a anexina conjugada a fluoresceína (FITC), a qual ao se ligar à fosfatidilserina translocada para a superfície celular permite a identificação das células apoptóticas, e o iodeto de propídio, um marcador nuclear cuja entrada na célula é dependente da perda da integridade da membrana, detectando assim células em processo de morte por apoptose tardia ou necrose (GATTI et al., 1998). Como esperado, células não tratadas apresentaram-se negativas para ambos os marcadores, como demonstrado por microscopia confocal e por citometria de fluxo. O uso destes marcadores mostrou que as células tratadas com 1x IC₅₀ e 2x IC₅₀ apresentaram comportamento semelhante ao do controle, com a maior parte das células apresentando fenótipos AV-/PI-. Apesar de muitos autores considerarem que as células duplamente negativas para AV e PI correspondem a células viáveis, nós não excluimos a possibilidade de que outros tipos de morte celular que não a apoptose e necrose possam estar atuando diminuindo a viabilidade celular e, por conseguinte, inibindo o crescimento das formas epimastigotas como observado nos testes biológicos. Por outro lado, é ainda possível que em baixas concentrações a inibição do crescimento destas formas se deva a um efeito citostático da droga.

Por outro lado, o tratamento com MBHA 3 na concentração de 4 x IC₅₀, tornou possível uma análise mais detalhada da morte celular induzida por este composto, permitindo a identificação de duas subpopulações distintas de parasitas. Uma pequena porcentagem das células (cerca de 9% após 72 h de tratamento) apresentou marcação para anexina, mas foram negativas para PI (AV+/PI-) caracterizando células em processo de apoptose (SOUZA et al., 2010). Outra subpopulação apresentou tanto dupla marcação para os dois marcadores (AV+/PI+) como só para PI (AV-/PI+) sendo caracterizada como células necróticas. Estes resultados apontam para uma heterogeneidade na susceptibilidade dos parasitas e pode explicar em parte os diferentes fenótipos observados através da análise ultraestrutural. A existência de células duplo marcadas, apesar de aparentemente conflitante, tem sido comumente observada em outros estudos (FERNÁNDEZ-PRESAS et al., 2010; KRYSKO et al., 2008). Uma explicação para isso é o fato de que devido à perda da integridade da

membrana a anexina pode ter acesso à fosfatidilserina presente no folheto interno da membrana. Além do mais, alguns estudos consideraram que as células positivas apenas para o IP estariam sofrendo um tipo mais drástico de morte celular por necrose, caracterizada por um dano excessivo à membrana, perda de citoplasma e fragmentação do DNA (JAMISON et al., 2002; MENNA-BARRETO et al., 2009). De fato, as células tratadas com 4x IC₅₀ mostraram intensa fragmentação do DNA através do ensaio de eletroforese com gel de agarose. Este efeito pode ser justificado em parte pela composição química do composto, visto que a produção excessiva de radicais livres pode causar um estresse oxidativo nas organelas intracelulares, inclusive no núcleo, e afetar seu DNA através de clivagem das fitas de DNA, “ligação cruzada” de proteínas e oxidação das purinas, levando, finalmente, ao processo de necrose (ZONG; THOMPSON, 2006).

Tendo em vista que a presença do fenótipo AV-/ PI- levanta dúvidas sobre a viabilidade celular, nós utilizamos a Calceína-AM associada com EH na tentativa de esclarecer se de fato células AV-/ IP- são células viáveis. A marcação das células tratadas com estes marcadores mostrou que a viabilidade celular, evidenciada pela ação de enzimas esterases sobre a calceína gerando um análogo fluorescente, foi inferior a observada com a anexina-IP. Estes resultados comprovam a hipótese de que o fenótipo AV-/IP- não necessariamente indica que as células estão vivas, mas apenas que elas não estão sofrendo apoptose e permanecem com suas membranas íntegras (PALMA et al., 2008). Estudos utilizando a calceína como sonda mostrou que este último marcador foi mais eficiente do que a anexina nos estudos de apoptose em linhagem de células de mamífero (GATTI, 1998). Nossos estudos parecem também apontar nesta direção. No entanto, a utilização da anexina foi essencial para distinção da apoptose e ainda permitiu identificar diferenças de susceptibilidade do parasita a droga.

O uso da laranja de acridina (LA) permitiu monitorar as alterações induzidas pelo MBHA 3 nas organelas vesiculares ácidas, visto que a LA tende a se acumular no interior destas organelas e emitir fluorescência vermelha devido ao baixo pH do ambiente (MONTE-NETO et al., 2011). Nas células tratadas com as concentrações mais baixas, nós observamos um aumento gradual no número de compartimentos ácidos marcados com LA, em comparação com as células controles. Como nestas concentrações não foram observadas alterações marcantes na maioria das células submetidas à marcação com a anexina ou calceína, este resultado sugere que as células podem estar sofrendo um processo de autodegradação, através da autofagia, como uma forma de se proteger dos danos causados pela droga nestas concentrações (ZANDBERGEN et al., 2010). Por outro lado, a diminuição

na intensidade de fluorescência da LA encontrada nas células tratadas com 4x IC₅₀ pode ser resultado da perda de integridade não só da membrana plasmática, mas também de membranas de lisossomos, acidocalcisomas, entre outros, levando a um vazamento intracelular de proteases ou de um influxo de Ca²⁺, resultando em morte celular por necrose (ZONG; THOMPSON, 2006).

A marcação com a Rhodamina 123 demonstrou o comprometimento da mitocôndria, organela fundamental para a sobrevivência da célula (SHANG et al., 2009). O tratamento com o MBHA 3 induziu uma redução gradual na intensidade de fluorescência das células, indicando que a função e a integridade da membrana mitocondrial foram afetadas. Esse resultado está de acordo com as alterações encontradas nesta organela através da microscopia de transmissão, como inchaço e rompimento das fibras do cinetoplasto, e sugere que o composto em dose elevada pode danificar o metabolismo de energia do parasita. Foi demonstrado que a perda de potencial de membrana está geralmente associada à depleção de energia celular, danos à membrana lipídica e/ ou perda de função de bombas/ canais de íons homeostáticos. Estes defeitos podem causar sinergia na indução de morte celular necrótica por perturbar a homeostase intracelular de íons, resultando em disfunção mitocondrial e produção de ATP diminuída (ZONG; THOMPSON, 2006). Estudos tem demonstrado que a presença de radicais nitro na molécula de MBHA 3 podem, ao serem reduzidas, levar à oxidação de componentes celulares tais como ácidos nucleicos e mitocôndria, esta última é altamente dependente das reações de oxi-redução (SANDES et al., 2010). É importante ter em mente, entretanto, que as alterações mitocondriais podem ter origem em um efeito primário direto sobre esta organela ou por lesões secundárias causadas por perda de viabilidade celular desencadeada por um outro componente da célula ou via metabólica (SOEIRO; CASTRO, 2011). Consistentemente, a análise do docking molecular apontou o potencial do composto em inibir a enzima TcFPPS, essencial para a síntese de esteróis do parasita, e que também poderia ser o ponto de partida para o mecanismo de morte celular, seja por autofagia, apoptose ou necrose (SANDES et al., 2010).

A importância de estudar o tipo de MCP induzida pelo MBHA 3 no *T. cruzi*, como visto previamente, relaciona-se com a maneira pela qual o hospedeiro irá responder diante da morte celular do parasita e como isso pode afetá-lo de forma local ou sistêmica. Por exemplo, a presença de parasitas em apoptose pode atenuar a resposta imune do hospedeiro, já que foi mencionado na literatura que macrófagos que fagocitam células apoptóticas secretam citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento-β (TGF-β), suprimindo uma resposta contra os parasitas. Por outro lado, as células do parasita que

entrarem em necrose podem provocar uma forte resposta imunológica no hospedeiro, visto que o material necrótico induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos fagócitos, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) (BRUCHHAUS et al., 2007).

Uma das principais questões que surgem a partir da identificação das vias de MCP em protozoários parasitas é como podemos aproveitar esses processos para combater alguns dos agentes infecciosos de grande importância para a saúde pública de forma mais eficiente (LÜDER et al., 2010). Pesquisas demonstraram que os parasitas protozoários utilizam as vias de MCP para restringir o número de parasitas em um hospedeiro e habilitar a propagação de apenas aqueles que estão em condição ideal (BRUCHHAUS et al., 2007; ZANDBERGEN, 2010). Apesar disso, a investigação sobre como esses parasitas morrem tem sido negligenciada, e os processos envolvidos após o tratamento com potenciais agentes quimioterápicos, ignorados (LÜDER et al., 2010). Dessa forma, estudos posteriores sobre os efeitos *in vivo* do composto MBHA 3 ainda são necessários para melhor caracterizar no hospedeiro a resposta elicitada pela morte do parasita causada por essa droga e ajudar no planejamento do esquema terapêutico de tratamento contra a doença de Chagas.

6 CONCLUSÕES

- O composto MBHA 3, obtido através da reação Morita-Bailys-Hillman, apresenta atividade tripanocida evidenciada pela forte inibição do crescimento de formas epimastigotas e promoção de lise de formas tripomastigotas, de maneira dose-dependente.
- O tratamento com o composto MBHA 3 induz alterações ultraestruturais severas compatíveis com variados fenótipos de morte celular, como demonstrado pela microscopia eletrônica de transmissão.
- Os dados obtidos pela marcação com Anexina/ IP e CA/ HE mostraram uma heterogeneidade na susceptibilidade dos parasitas. No entanto, o tratamento com o composto em alta concentração induz um processo de MCP por necrose na maioria dos parasitas.
- Os valores positivos do IV da LA e no número de compartimentos ácidos marcados nos parasitas tratados com baixas concentrações do composto, sugerem que um processo de MCP por autofagia possa estar acontecendo nessas células, no intuito de se proteger dos danos causados pela droga.
- A marcação com a Rodamina 123 detectou o comprometimento das mitocôndrias, que poderia ser resultado de estresse oxidativo causado pelos radicais nitro presentes na estrutura do MBHA 3.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, V. E. et al. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 283, p. 3454-3464, 2007.
- ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 158, p. 389-394, 2002.
- BARBOSA et al. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 19, p. 4250-4256, 2011.
- BARBOSA et al. Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **Eur. J. Med. Chem.**, Paris, v. 44, p. 1726-1730, 2009.
- BASAVIAIAH, D. et al. The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. **Chem. Soc. Rev.**, London, v. 36, p. 1581-1588, 2007.
- BASAVIAIAH, D.; VEERARAGHAVIAIAH, G. The Baylis-Hillman reaction: a novel concept for creativity in chemistry. **Chem. Soc. Rev.**, London, v. 41, p. 68-78, 2012.
- BENAIM, G. et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 49, p. 892-899, 2006.
- BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 127, p. 23-35, 2003.
- BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 364, p. 2527-2534, 2011.
- BRUCHHAUS, I. et al. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 23, p. 376-383, 2007.
- BURSCHE, W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. **Cell Death Diff.**, Oxford, v. 8, p. 569-581, 2001.
- BÜTTNER, S. et al. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. **Mol. Cell**, Cambridge, v. 25, p. 233-246, 2007.
- CHOSE, O. et al. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 276, p. 32-39, 2002.
- CHOSE, O. et al. Cell death in protists without mitochondria. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1010, p. 121-125, 2003.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, London, v. 465, p. S4-S5, 2010a.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, London, v. 465, p. S12-S15, 2010b.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, p. 641-615, 2011.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, p. S6-7, 2010.

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 215-220, 1999.

DAS, B. et al. Synthetic Applications of Baylis–Hillman Chemistry: An Efficient and Solely Stereoselective Synthesis of (E)- α -Methylcinnamic Acids and Potent Hypolipidemic Agent LK-903 from Unmodified Baylis–Hillman Adducts. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 54, p. 1725-1727, 2006.

DAS, M. et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Cell. Sci.**, London, v. 114, p. 2461-2469, 2001.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 33, p. S13-S22, 2007.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 3, p. 251- 261, 2005.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 50, p. 113-119, 2011.

DUSZENKO, M. et al. Autophagy in protists. **Autophagy**, Georgetown, v. 7, p. 127-158, 2011.

DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, p. 536–542, 2006.

FERNÁNDEZ-PRESAS, A.M. et al. Specific antibodies induce apoptosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 106, p. 1327-1337, 2010.

FESTJENS, N. et al. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1757, p. 1371-1387, 2006.

- FIGUEIREDO, R. C. B. Q. et al. Reserosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. **Parasitology.**, London, v. 129, p. 431–438, 2004.
- GABELLI, S. B. et al. Structure and mechanism of the farnesyl diphosphate synthase from *Trypanosoma cruzi* : implications for drug design. **Proteins.**, New York, v. 62, p. 80-88, 2006.
- GANNAVARAM, S. et al. Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. **J. Cell. Sci.**, London, v. 121, p. 99-109, 2008.
- GATTI, R. et al. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 46, p. 895-900, 1998.
- GUIMARÃES, A. C.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 271, p. 1638-1650, 2004.
- GUTIERREZ, F. R. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* -induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect. Immun.**, Washington, v. 79, p. 1873-1881, 2011.
- HEUSER, J. E. A critical comparison between the two current methods of viewing frozen, live cells in the electron microscope: cryoelectron microscopic tomography versus “deep-etch” electron microscopy. **Biomed. Rev.**, Varna, v. 12, p. 11-29, 2001.
- HUANG, C. H. et al. Binding of nitrogen-containing bisphosphonates (N-BPs) to the *Trypanosoma cruzi* farnesyl diphosphate synthase homodimer. **Proteins.**, New York, v. 78, p. 888-899, 2010.
- JAMISON, J. M. et al. Autoschizis: a novel cell death. Biochemical. **Pharmacology**, Basel, v. 63, p. 1773–1783, 2002.
- KERR, J.F.R. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, London, v. 26, p. 239–257, 1972.
- KIEL, J. A. Autophagy in unicellular eukaryotes. **Philos. trans. royal soc. Lon.;Ser. B;Biol. sci.**, London, v. 365, p. 819-30, 2010.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ.**, Oxford, v. 16, p. 3-11, 2009.
- KRYSKO, D.V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods.**, Orlando, v. 44, p. 205-21, 2008.
- KUNDU, M. K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2methylene-propionic acid derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Oxford, v. 9, p. 731-736, 1999.
- LAPORTE, C. et al. A necrotic cell death model in a protist. **Cell Death Differ.**, Oxford, v. 14, p. 266-274, 2007.

- LOUP, G. et al. Update in treatment of Chagas disease. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v. 24, p. 428-434, 2011.
- LÜDER, C. G. et al. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasit. Vectors.**, London, v. 3, p. 116, 2010.
- MACFARLANE, M. Cell death pathways-potential therapeutic targets. **Xenobiotica**, London, v. 39, p. 616-624, 2009.
- MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v. 115, p. 1109-1123, 2007.
- McKERRROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 263-269, 2009.
- MELO, R.C. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Cell. Mol. Med.**, Bucharest, v. 13, p. 279-94, 2009.
- MENNA-BARRETO, R. F. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi* : an ultrastructural study. **Micron.**, Oxford, v. 40, p.157-168, 2009.
- MONTE NETO, R.L. et al. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 127, p. 215-221, 2011.
- MUKHERJEE, P. et al. Probing the structures of leishmanial farnesyl pyrophosphate synthases: homology modeling and docking studies. **J. Chem. Inf. Model.**, Washington, v. 48, p. 1026-1040, 2008.
- NASIRUDEEN, A. M. et al. Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. **Microbiology**, New York, v. 150, p. 33-43, 2004.
- NERES, J. et al. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* transialidase from in silico screening. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Oxford, v. 19, p. 589-596, 2009.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease: control and elimination. **Sixty-Third World Health Assembly.**, Geneve, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, Control of Chagas Diseases. **Techn. Rep. Series.** Geneve, v. 905, p.1-109, 2002.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. **World Health Organization Report.** Geneve, 2007.
- PADDOCK, S.W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. **Mol. Biotechnol.**, Totowa, v. 16, p. 127-49, 2000.

- PALMA, P.F. et al. Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 12, p. 108-114, 2008.
- PARRISH, J. et al. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. **Nature**, London, v. 412, p. 90-94, 2001.
- PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 72, p. 441-446, 2009.
- PETHERICK, A. Country by country. **Nature.**, London, v. 465, p. S10-11, 2010.
- PICOT, S. et al. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 91, p. 590–591, 1997.
- RASSI JR., A. Et al. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 17, p. 1388-1402, 2010.
- RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, Dayton, v. 11, p. 342-357, 2006.
- RIGDEN, D. J. et al. Autophagy in protists: Examples of secondary loss, lineage-specific innovations, and the conundrum of remodeling a single mitochondrion. **Autophagy**, Georgetown, v. 5, p. 784- 94, 2009.
- ROSSO, V. S. et al. Synthesis and biological evaluation of new 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 19, p. 2211-2217, 2011.
- ROY, A. et al. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Mol. Pharmacol.**, New York, v. 74, p. 1292-1307, 2008.
- SANDES, J. M. et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic Chem.**, New York, v. 38, p. 190-195, 2010.
- SANTOS Filho, J. M. dos et al. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 17, p. 6682-6691, 2009.
- SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 31, p. 1403-1415, 2001.
- SCHORMANN, N. et al. Synthesis and characterization of potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 18, p. 4056-4066, 2010.
- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 123, p. 233–244, 2006.

- SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 49, p. 117-143, 1995.
- SILVA, F.P. et al. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts. **Eur. J. Med. Chem.**, Paris, v. 46, p. 4295-4301, 2011.
- SILVA, N. L. C. et al. Reservosomes: multipurpose organelles? **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 99, p. 325-327, 2006.
- SOARES, M. J. et al. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Sci.**, London, v. 102, p. 157-167, 1992.
- SOEIRO, M. N.; CASTRO, S. L. de. Screening of Potential anti-*Trypanosoma cruzi* Candidates: In Vitro and In Vivo Studies. **Open Med. Chem. J.**, Amsterdam, v. 5, p. 21-30, 2011.
- SOUZA, E. M. de, et al. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, London, v. 133, p. 75-79, 2006.
- SOUZA, E. M. de, et al. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi* -infected heart cells in vitro. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 341, p. 173-180, 2010.
- SOUZA, R. O. M. A. de, et al. Hexamethylenetetramine as a cheap and convenient alternative catalyst in the Baylis-Hillman reaction: synthesis of aromatic compounds with anti-malarial activity. **Synthesis.**, Stuttgart, v. 42, p. 1595-1600, 2004.
- SOUZA, W. de. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v. 8, p. 269-285, 2002.
- SOUZA, W. de. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, p. 313-325, 2008.
- SZAJNMAN, S. H. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 16, p. 3283-3290, 2008.
- TEIXEIRA, A. R. L. et al., Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 463-491, 2006.
- TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas Didático: Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro: CECIERJ/CEDERJ, 2011. 50 p. Disponível em: <<http://labspace.open.ac.uk/course/view.php?id=7590>>. Acesso em: 26 jan. 2012.
- UCHIYAMA, Y. et al. Autophagy-physiology and pathophysiology. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 129, p. 407-420, 2008.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 9, p. 495-501, 2003.

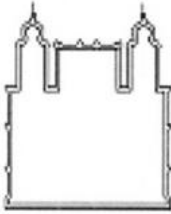
VASCONCELLOS, M. L. A. A. et al. Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest. Manage. Sci.**, Sussex, v. 62, p. 288-296, 2006.

WHO, how, what and where? **Nature**, London, v. 465, p. S8-S9, 2010.

ZANDBERGEN, G. van, et al. Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 26, p. 477- 483, 2010.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 20, p. 1-15, 2006.

ANEXO A



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

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

número P-427/07, proposto por Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo, foi licenciado pelo N° L-001/08.

Sua licença de N° L-001/08 autoriza o uso anual de :

- 2 *Oryctolagus cuniculus*

- 400 *Mus musculus*

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

Rio de Janeiro, 24/09/2008


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ