

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autofagia no *Trypanosoma cruzi*: produto do mecanismo de ação de naftoquinonas e da resposta ao estresse de pH e nutricional

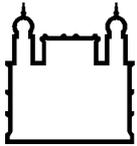
Michelle Casal Fernandes

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Dra. Solange Lisboa de Castro

Agosto 2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta dissertação intitulada:

Autofagia no *Trypanosoma cruzi*: produto do mecanismo de ação de naftoquinonas e da resposta ao estresse de pH e nutricional

apresentada por

Michelle Casal Fernandes

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Leonor L. P. Leon (presidente) – IOC/FIOCRUZ

Dra. Thaïs C. B. S. Souto-Padrón – IMPG/UFRJ

Dra. Roberta O. Pinheiro – IOC/FIOCRUZ

Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro (suplente) – IOC/FIOCRUZ

Dra. Helene S. Barbosa (revisora/suplente) – IOC/FIOCRUZ

Dissertação defendida e aprovada em 30 de agosto de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

F363 Fernandes, Michelle Casal.

Autofagia no *Trypanossoma cruzi*: produto do mecanismo de ação de naftoquinonas e da resposta ao estresse de pH e nutricional / Michelle Casal Fernandes. – Rio de Janeiro, 2012.

xv, 109 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.

Bibliografia: f. 82-98

1. *T. cruzi*. 2. Naftoquinonas. 3. Autofagia. 4. Quimioterapia.

Título.

CDD 616.936 3

Esta tese foi desenvolvida sob orientação dos Drs. Rubem F. S. Menna-Barreto e Solange Lisboa de Castro no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro do CNPq, Faperj e Fiocruz.

"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação... Mas se você não fizer nada, não existirão resultados."

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas inúmeras vezes que me fez forte quando eu me sentia tão fraca, por abrir as janelas quando todas as portas estavam fechadas. Se eu não confiasse tanto em Ti, eu não estaria aqui. Obrigada.

Aos meus queridos orientadores Drs. Rubem Menna-Barreto e Solange de Castro por tanta paciência, dedicação, apoio, disponibilidade e carinho. Sou grata pelo aprendizado proporcionado desde a iniciação científica e a amizade construída ao longo desse tempo.

À minha mãe Graça, meu irmão Filipe e meu noivo Diogo pelo incentivo, compreensão, amor e paciência dedicados a mim. Sem o apoio de vocês frente a tantas preocupações, nada teria acontecido. Vocês são meus pilares, meu orgulho. Amo vocês.

Ao meu pai André, minha avó Anna e minha madrinha Irani, pelo incentivo e carinho, que em todos os momentos me impulsionaram para frente.

Às Dras. Kelly Salomão e Elen de Melo, pela ajuda dentro e fora da bancada em todas as vezes que precisei.

Às amigas Marcelle Caminha, Thabata Duque, Xênia Souto, Aruanna Cajaty, Ana Helisa, Paula Vianna, Natália Abinader e Ana Cristina (“Rubetes” e “agregadas”), pelas conversas na sala de cultura, companhia nos seminários intermináveis, discussões científicas e filosóficas. Foi bom ter com quem dividir a bancada durante os feriados, greves e finais de semana. Com certeza o trabalho ficava mais fácil. Ao Gustavo Paris, pela auxílio com os compostos.

À Nathalia Souza, pela ajuda nos experimentos de fragmentação de DNA, pela compreensão e paciência em diversos momentos.

Ao Vítor Vidal, pelo importante apoio quando tudo parecia estar perdido.

Às meninas do LBC, em especial Cristiane França e Denise Gama, pelas inesgotáveis conversas, sempre seguidas de muita risada e pela boa vontade em atender-me todas as vezes que foram solicitadas.

À Patrícia Bernardino e ao Marcos Meuser, pelo apoio técnico desenvolvido e essencial para nosso laboratório.

À Dra. Maria de Nazaré por ter me recebido no Laboratório de Biologia Celular e sempre ter sido uma grande incentivadora de todos nós.

A todos os professores das disciplinas da BCM, pelo excelente trabalho realizado, sempre mostrando amor pelo que fazem me contagiaram e me fizeram perceber que ciência não se aprende. Ciência se vive, se pensa e se apaixonava. Em especial as Drs. Helene Barbosa, Andrea Luz e Dr. Rubem Menna-Barreto por terem me feito sair encantada de suas salas de aula.

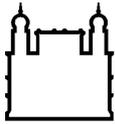
Aos Drs. Eufrânio da Silva Jr. e Maria Vargas pela síntese dos compostos testados.

À Dra. Helene pela excelente revisão desta dissertação.

À banca: Dras. Leonor Leon, Thaís Souto-Padrón e Roberta Olmo pelas correções e contribuição com ideias valiosas para o prosseguimento deste trabalho.

Às Plataformas de Citometria de Fluxo e Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, tão necessárias para a perfeita conclusão deste trabalho.

Ao CNPq, Faperj e FIOCRUZ, pelo suporte financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

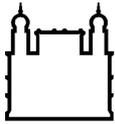
Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michelle Casal Fernandes

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, representa um sério problema de Saúde Pública na América Latina, cujo tratamento clínico é insatisfatório. Nesse contexto, muitos esforços têm sido dirigidos para o desenvolvimento de novas drogas visando o tratamento desta doença negligenciada. Na medicina popular, produtos naturais ricos em naftoquinonas têm sido utilizados no combate de diferentes doenças parasitárias. Nosso grupo vem investigando a atividade de naftoquinonas e derivados sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*. No presente estudo, dentre 32 hidroxinaftoquinonas que tiveram sua atividade tripanocida avaliada, o composto **1C** foi o mais ativo ($IC_{50}/24h=77,3 \pm 6,8 \mu M$). Estudos prévios do nosso grupo com outra classe de derivados de naftoquinonas apontaram para a naftoquinona triazólica (**NT**) como um composto promissor, sendo esta mais ativa que a droga padrão benznidazol. Nesta dissertação, o mecanismo de ação de **NT** foi estudado, sendo observados danos ultraestruturais em epimastigotas como a ruptura dos reservosomos, *blebbing* da membrana flagelar, desorganização do Golgi, aparecimento de estruturas membranares concêntricas no citosol e parasitos anormais com múltiplos flagelos. Diferentemente do tratamento com outras naftoquinonas, **NT** não induziu alterações na mitocôndria, dado este confirmado pela análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo. Pela mesma técnica, ainda foram demonstrados o efeito de **NT** no bloqueio da mitose e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O principal fenótipo induzido pelo tratamento com essa naftoquinona foi o aparecimento de perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas, que juntamente com o aumento da marcação com monodansilcadaverina (MDC) observado, sugere a autofagia como parte do mecanismo de ação tripanocida da **NT**. O *T. cruzi* apresenta-se em três diferentes formas evolutivas e durante seu ciclo de vida é exposto a condições físico-químicas adversas como variações no pH e escassez de nutrientes. A avaliação do efeito de tais condições se constituiu em um dos objetivos deste estudo. Análises por citometria de fluxo demonstraram que epimastigotas submetidos a estresse de pH e escassez nutricional apresentaram um aumento na produção de EROs, sendo também observada uma queda do $\Delta\Psi_m$ apenas após estresse de pH. A microscopia eletrônica de transmissão revelou um inchaço mitocondrial com desorganização das cristas, presença de estruturas membranares concêntricas citosólicas e no interior de organelas, perfis de retículo endoplasmático envolvendo estruturas subcelulares, perda de eletrondensidade dos reservosomos com invaginação da sua membrana e intensa vacuolização citoplasmática. Estes fenômenos característicos de autofagia, reforçados pela ausência de ruptura de membrana plasmática, de fragmentação do DNA e pelo aumento na marcação de MDC, indicam que esta via participa da resposta do protozoário aos diferentes tipos de estresses induzidos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michelle Casal Fernandes

Chagas' disease, caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi*, represents a severe Public Health problem in Latin America, being its clinical treatment unsatisfactory. In this framework, several efforts have been directed for the development of novel drugs for the treatment of this neglected disease. In the folk medicine, natural products containing naphthoquinones have been employed for the treatment of different parasitic illnesses. Our research group has been investigating the activity of naphthoquinones and derivatives against *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes. In the present study, among 32 hydroxynaphthoquinones, evaluated for their trypanocidal activity, compound **1C** was the most effective ($IC_{50}/24h=77,3 \pm 6,8 \mu M$). Previous studies by our group with another naphthoquinones class of derivatives, pointed to the triazolic naphthoquinone (**NT**) as a promising compound, being more active than the reference drug benznidazol ($IC_{50}/24h=103,6 \pm 0,6 \mu M$). In this work, the mechanism of action of **NT** was also studied, being many ultrastructural damage described in epimastigotes such as the rupture of the reservosomes membrane, blebbing in the flagellar membrane, Golgi disruption, the formation of concentric membranous structures in the cytosol and the appearance of abnormal parasites with multiple flagella. Differently from the treatment with other naphthoquinones, **NT** did not induce mitochondrial alterations, data confirmed by mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by flow cytometry. By the same technique, it was also demonstrated the effect of **NT** on mitosis blockage and in the increase in reactive oxygen species (ROS) production. The main phenotype induced by the treatment with this naphthoquinone was the appearance of endoplasmic reticulum profiles surrounding organelles associated with the increase in monodansylcadaverine (MDC) labeling observed, suggests that autophagy is involved in the trypanocidal effect of **NT**. *T. cruzi* presents three different evolutive forms, and during its life cycle is exposed to adverse physico-chemical conditions such as pH variation and the shortage of nutrients, being the evaluation of the effect of these conditions one of the goals of this study. Flow cytometric analysis demonstrated that epimastigotes submitted to pH stress and nutritional scarcity presented an increase in ROS generation, being also observed a decrease in $\Delta\Psi_m$ detected only after the pH stress. The transmission electron microscopy revealed the mitochondrial swelling with crists disorganization, the formation of membranous concentric structures in the cytosol or inside organelles, the appearance of endoplasmic reticulum profiles surrounding subcellular structures, loss of reservosome electrondensity with the invagination of its membrane, and the intense citoplasmic vacuolization. Such characteristic phenomena of autophagy, reinforced by the absence of the plasma membrane rupture, DNA fragmentation and increase in MDC labeling, indicate that this pathway participates in the protozoa response to different types of induced stresses.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$ = potencial de membrana mitocondrial

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BENEFIT = Estudo clínico randomizado controlado por placebo do tratamento com benznidazol em pacientes com cardiopatia chagásica crônica

Bz = Benznidazol

Ca^{+2} -ATPase = ATPase dependente de cálcio

Ca^+/H^+ = bomba cálcio-próton

DHE = dihidroetídio

DME = meio Eagle modificado por Dulbecco

DME's = DME + 10% soro fetal bovino + 2% L- glutamina

DMSO = dimetilsufóxido

DNA = ácido desoxiribonucleico

DNDi = *Iniciativa* Medicamentos para Doenças Negligenciadas

ERO = Espécie Reativa de Oxigênio

FCCP = Carbonilcianeto-p-trifluormetoxifenilhidrazona

FDA = *Food and Drug Administration*

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

H^+ -ATPase = bombas próton-ATPase

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

H^+ -PPase = próton-pirofosfatase

IC_{50} = concentração que inibe 50% dos parasitos

IP = iodeto de propídio

kDNA= DNA de cinetoplasto

LAFEPE = Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

MDC = Monodansilcadaverina

MET = microscopia eletrônica de transmissão

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MSF = Médicos Sem Fronteira

Na^+/H^+ = bomba sódio- próton

NT = naftoquinona triazólica (2,2-dimetil-3-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2,3-dihidronafto[1,2-b]furano-4,5-diona)

O_2^- = ânion superóxido

OH^\cdot = radical hidroxila

OMS= Organização Mundial de Saúde

PAS= estrutura pré-autofagosomal

PBS = solução salina tamponada com fosfato

SFB = soro fetal bovino

TMRE = ester de tetrametil rodamina

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2. Aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares do <i>T. cruzi</i>	3
1.3. Doença de Chagas.....	9
1.3.1. Aspectos clínicos.....	9
1.3.2. Aspectos epidemiológicos.....	11
1.3.2.1. Transmissão oral e na Amazônia.....	11
1.3.2.2. Globalização da doença de Chagas.....	12
1.3.2.3. Profilaxia da doença de Chagas.....	14
1.3.3. Tratamento	16
1.3.4. Perspectivas para novos quimioterápicos.....	19
1.4. Naftoquinonas.....	21
1.5. Autofagia.....	27
1.5.1. Histórico.....	28
1.5.2. Tipos de autofagia.....	28
1.5.2.1. Autofagia mediada por chaperona.....	28
1.5.2.2. Microautofagia.....	29
1.5.2.3. Macroautofagia.....	30
1.5.3. Autofagia em tripanosomatídeos.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Efeito de naftoquinonas sobre <i>T. cruzi</i>	47
4.2. Efeito do estresse de pH e nutricional sobre formas epimastigotas.....	57
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
8. ANEXO.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Triatoma infestans</i> , inseto transmissor da doença de Chagas	2
Figura 1.2. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 1.3. Esquema representativo de epimastigota de <i>T. cruzi</i>	5
Figura 1.4. Paciente apresentando Sinal de Romaña	10
Figura 1.5. Principais rotas de imigrantes da América Latina para países não endêmicos	14
Figura 1.6. As casas de pau a pique podem abrigar triatomíneos	15
Figura 1.7. Drogas utilizadas no tratamento clínico da doença de Chagas.....	16
Figura 1.8. Mecanismo geral de ação de quinonas e produção de EROs	22
Figura 1.9. Estrutura química das naftoquinonas	22
Figura 1.10. Ipês ou <i>Tabebuia</i> sp.	23
Figura 1.11. Estrutura química da naftoquinona triazólica	27
Figura 1.12. Formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperona	29
Figura 1.13. Representação esquemática da macroautofagia	31
Figura 3.1. Rota de síntese de NT	37
Figura 3.2. Estrutura química das hidroxinaftoquinonas	38
Figura 4.1. Efeito de NT na proliferação de <i>T. cruzi</i>	49
Figura 4.2. Micrografia eletrônica de transmissão de epimastigota de <i>T. cruzi</i>	50
Figura 4.3. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados com 3 μ M NT	52
Figura 4.4. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados com 6 μ M NT	53
Figura 4.5. Análise por microscopia de fluorescência da marcação com MDC de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com NT	54
Figura 4.6. Análise do ciclo celular de epimastigotas tratados com NT por citometria de fluxo	54
Figura 4.7. Análise por microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas tratados com NT	55

Figura 4.8. Avaliação da produção de ROS em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com NT por citometria de fluxo	56
Figura 4.9. Cinética de alcanilização e acidificação do meio LIT por epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	57
Figura 4.10. Viabilidade de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos a diferentes condições de estresse de pH e nutricional	60
Figura 4.11. Efeito do estresse de pH e nutricional no tamanho e granulosidade em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	61
Figura 4.12. Avaliação da produção de EROs em parasitos submetidos a estresse de pH e nutricional	62
Figura 4.13. Análise da integridade da membrana plasmática e da fragmentação de DNA em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos ao estresse de pH e nutricional	63
Figura 4.14. Análise por microscopia de fluorescência da marcação com MDC de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos às condições de estresse	64
Figura 4.15. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados por 96h em LIT pH7 + 10%SFB e 20%SFB.....	65
Figura 4.16. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados por 96 h em LIT pH7 + 0%SFB.....	66
Figura 4.17. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados por 96 h em LIT pH 7 + 0% SFB	67
Figura 4.18. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados por 96h em LIT ácido	69
Figura 4.19. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados por 96h em LIT com pH básico	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais drogas contra a doença de Chagas e seus mecanismos de ação sugeridos	20
Tabela 3.1. Hidroxinaftoquinonas estudadas	39
Tabela 4.1. Atividade dos compostos sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	47
Tabela 4.2. Valores de IC50 (μM) de NT nas diferentes formas de <i>T. cruzi</i>	48
Tabela 4.3. Análise do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com NT por citometria de fluxo	51
Tabela 4.4. Análise do $\Delta\Psi\text{m}$ em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos a estresse de pH e nutricional	59

1. INTRODUÇÃO

Em 1909, a doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas, tornando-se conhecida como uma importante doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Na época, o pesquisador brasileiro não somente identificou o agente etiológico e o vetor da doença, como também descreveu o ciclo biológico do parasito e sua principal via de transmissão (Chagas, 1909).

Também conhecida por tripanossomíase americana, esta zoonose é bastante difundida na América Latina. Estudos em múmias sub-andinas em regiões do deserto do Atacama demonstraram evidências da doença de Chagas há 9.000 anos (Aufderheide et al., 2004; Fernandes et al., 2008). Uma hipótese da origem da doença se baseia no fato que o aumento das atividades agrícolas e a domesticação de animais deram início a interação parasito-homem há 10.000 anos, que até então era restrita aos animais selvagens (revisto em Coura & Viñas, 2010).

1.1. O ciclo evolutivo do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado da ordem kinetoplastida, família trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* sp.. O vetor deste parasito é o inseto conhecido popularmente como barbeiro, pertencente à ordem hemiptera, família reduviidae e subfamília triatominae (**Figura 1.1**). O parasito é transmitido por diversas espécies de triatomíneos, sendo os principais vetores: *Triatomas infestans*, *Rhodinus prolixus* e *Triatoma dimidiata* (revisto em Rassi et al., 2010).



Figura 1.1. *Triatoma infestans*, inseto transmissor da doença de Chagas (Adaptado de Noireau et al., 2005).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* envolve o hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e o vertebrado (mamíferos incluindo o homem). Durante o repasto sanguíneo, o inseto pode se alimentar do sangue contendo formas tripomastigotas que alcançam a porção anterior do intestino onde se diferenciam em epimastigotas. No lúmen do intestino médio do inseto, estas formas epimastigotas proliferam por divisão binária e migram ativamente para a porção final do intestino, local onde ocorre a diferenciação para tripomastigotas metacíclicos, processo este denominado metaciclogênese (Schaub & Lösch, 1988; Kollien et al., 1998). Por sua vez, as formas metacíclicas, altamente infectivas e não proliferativas, são eliminadas juntamente com as fezes e urina do triatomíneo durante seu repasto sanguíneo no mamífero.

No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos infectam as primeiras células que encontram no sítio de inoculação, como macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Já no meio intracelular, estes parasitos se diferenciam em amastigotas no citoplasma da célula hospedeira. Os amastigotas são altamente proliferativos e após várias divisões, novamente se diferenciam para tripomastigotas que serão liberados para o meio extracelular após a ruptura da célula. Esses tripomastigotas poderão então invadir outras células vizinhas ou através da corrente sanguínea alcançar outros tecidos. O ciclo se fecha quando um novo triatomíneo se alimentar deste mamífero infectado (**Figura 1.2**).

1.2. Aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares do *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta organelas típicas das células eucarióticas e outras que lhe são próprias (**Figura 1.3**) (revisto em De Souza, 1984, 2002). Ao longo do ciclo evolutivo, os parasitos sofrem modificações na forma do seu corpo e na posição relativa de algumas organelas (revisto em Gull, 1999). As diferentes formas do parasito são caracterizadas principalmente pelo tamanho e posição do flagelo. Em tripomastigotas, o flagelo emerge da bolsa flagelar na região posterior do protozoário; já em epimastigotas, o flagelo emerge da região antero-lateral do parasito, percorrendo aderido ao longo do corpo. Amastigotas são formas arredondadas intracelulares que possuem flagelo curto interiorizado (revisto em De Souza, 2002).

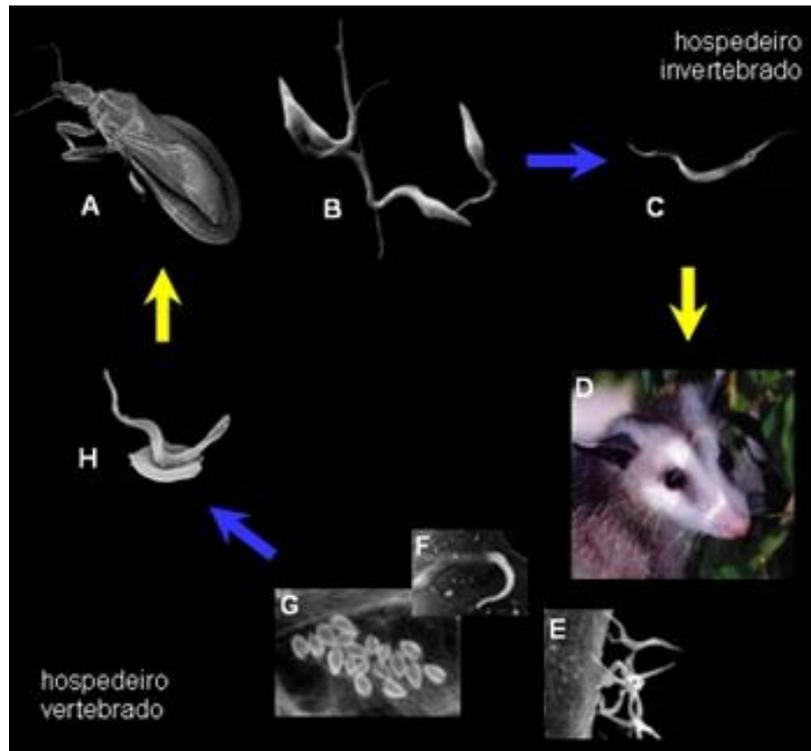


Figura 1.2. Ciclo evolutivo do *T. cruzi*. Insetos triatomíneos durante o repasto sanguíneo ingerem as formas tripomastigotas (A), que diferenciam-se em epimastigotas, formas proliferativas no vetor (B). Na ampola retal, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas e são excretadas nas fezes (C) infectando o hospedeiro vertebrado (D), durante o repasto sanguíneo. Após adesão (E) e penetração (F) nas células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (G), que se dividem e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos (H) que são liberados para o meio extracelular infectando células vizinhas ou distantes através da corrente sanguínea (FIOCRUZ, 2012).

A membrana plasmática do parasito é composta por proteínas, lipídeos e carboidratos, estes últimos distribuídos na face externa, formando o glicocálix presente por toda superfície (De Souza et al., 1978). Na membrana do parasito são encontradas moléculas de colesterol. Este esterol é captado do hospedeiro ou do meio por endocitose, visto que o parasito não é capaz de sintetizá-lo (Soares & De Souza, 1991; revisto em Urbina, 2002). A membrana plasmática de formas epimastigotas e amastigotas possui uma região especializada chamada citóstoma (De Souza et al., 1978). O citóstoma está localizado

próximo à bolsa flagelar e através dessas regiões ocorre a incorporação de macromoléculas exógenas com formação de pequenas vesículas (Soares, 1999). Estas vesículas ou endosomos iniciais se fundem a estruturas maiores chamadas reservosomos.

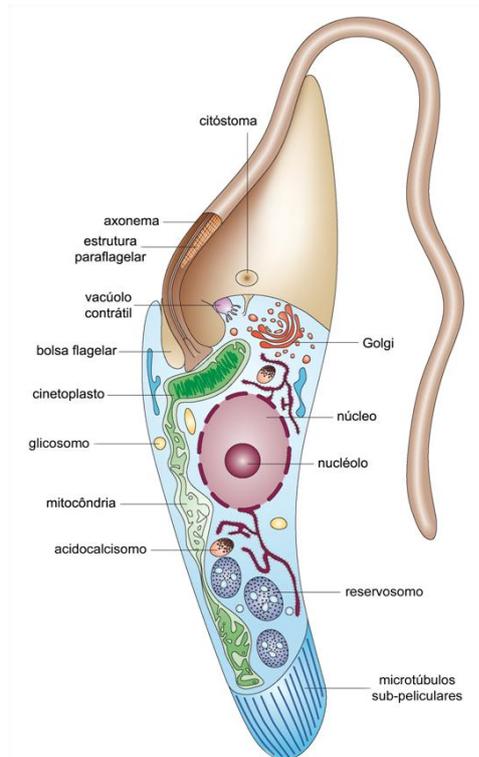


Figura 1.3. Esquema representativo de epimastigota de *T. cruzi* (Adaptado de Docampo et al., 2005).

Os reservosomos são organelas esféricas presentes na região posterior das formas epimastigotas e são consideradas organelas pré-lisossomais devido à ausência de marcadores de lisosomos e ter seu conteúdo ácido (pH 6). Esta organela é formada por matriz eletrodensa composta por proteínas e inclusões lipídicas eletrolúcidas, tendo dentre as proteases mais abundantes, a cruzipaína (principal cisteína proteinase de *T. cruzi*) e serina carboxipeptidase. Assim, a presença destas proteases indica que os reservosomos podem ser o principal sítio de proteólise em epimastigotas. A respeito da via endocítica desse tripanosomatídeo, acredita-se que epimastigotas endocitam macromoléculas através do citóstoma e/ou bolsa flagelar, e o conteúdo endocitado é conduzido aos reservosomos por vesículas endocíticas (Soares, 1999). Entretanto nesse

protozoário, esta via é bastante controversa, sendo que outra hipótese aceita envolve a existência de endosomos iniciais tubulares e os reservosomos como lisosomos maduros (Porto-Carreiro et al., 2000).

Além de estar relacionado à via endocítica em epimastigotas, os reservosomos são responsáveis por estocar proteínas e lipídeos, que servem como fonte energética em situações de estresse nutricional, como na metaciclogênese (Pereira et al., 2011). Durante esse processo, ocorrem modificações na estrutura do reservosomo com desaparecimento das inclusões lipídicas seguido pelo desaparecimento total da própria organela (revisto em Soares et al., 1992).

Os microtúbulos subpeliculares representam um arranjo regular de microtúbulos ligados entre si e à membrana, localizados imediatamente abaixo e ao longo de toda a membrana plasmática do *T. cruzi*, exceto na bolsa flagelar e no citóstoma. Essa estrutura é a responsável por manter a forma e rigidez do protozoário (revisto em De Souza, 1999 e em Field & Carrington, 2009).

Todos os eucariontes pertencentes à ordem kinetoplastida, como o *T. cruzi*, apresentam uma mitocôndria única e ramificada (Paulin, 1975), localizada abaixo dos microtúbulos subpeliculares por todo o corpo celular (revisto em De Souza et al., 2009). Recentemente, foi descrita a plasticidade funcional e metabólica da mitocôndria ao longo do ciclo evolutivo do parasito. A hipótese levantada sugere que epimastigotas apresentem a mitocôndria funcional devido à maior disponibilidade de substrato da cadeia transportadora de elétrons no intestino médio do triatomíneo. Já tripomastigotas sanguíneos apresentam a organela pouco funcional devido à escassez de substratos no sangue, sendo sua principal fonte energética a glicólise (Gonçalves et al., 2011). Essas variações no metabolismo mitocondrial também levam a diferenças na susceptibilidade ao estresse oxidativo detectado nas diferentes formas do parasito (Atwood et al., 2005; Gonçalves et al., 2011).

A extremidade da mitocôndria próxima a bolsa flagelar concentra todo o DNA mitocondrial do parasito, sendo esta porção denominada cinetoplasto. O DNA de cinetoplasto (kDNA) é constituído por uma rede de DNA composta por milhares de minicírculos e dezenas de maxicírculos interconectados (Shapiro & Englund, 1995). Os maxicírculos são análogos ao DNA mitocondrial de

eucariotos superiores em relação à estrutura e funcionalidade, sendo responsáveis por codificar RNA ribossomal e subunidades dos complexos respiratórios mitocondriais. Os minicírculos codificam RNA que modificam os transcritos dos maxicírculos em um processo chamado edição de RNA (Stuart & Panigrahi, 2002). Entretanto, apesar do kDNA representar cerca de 30% do DNA total do parasito, poucas proteínas são sintetizadas na mitocôndria, sendo a maioria importada do citosol (revisto em De Souza et al., 2009). A característica morfológica do cinetoplasto varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do protozoário, sendo em forma de bastão nas formas epimastigotas e amastigotas, e arredondado em tripomastigotas (De Souza, 2002).

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* passa por processos de diferenciação (metaciclogênese, tripomastigota-amastigota e amastigota-tripomastigota) que são acompanhados por mudanças cruciais na morfologia, transporte intracelular e metabolismo primário. Todas as formas do parasito possuem um flagelo (sendo o tamanho variável de 1 µm em amastigotas a 20 µm em tripomastigotas) (revisto em De Souza, 2002) emergente de uma invaginação da membrana plasmática na base do flagelo, chamada bolsa flagelar. O flagelo é formado por um axonema típico de eucariotos, com padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central (9+2), conectado à estrutura paraflagelar, que é formada por um complexo arranjo de filamentos compostos por inúmeras proteínas (revisto em De Souza, 2009). Nos flagelos de epimastigotas e tripomastigotas existem as zonas de adesão flagelar compostas por proteínas transmembranares, responsáveis por aderir parte do flagelo ao corpo celular (revisto em De Souza, 1984, 2002). A bolsa flagelar está associada fisicamente ao corpúsculo basal que por sua vez encontra-se conectado ao cinetoplasto (revisto em Field & Carrington, 2009). Essa ligação entre o cinetoplasto e o flagelo desempenha um papel fundamental na segregação da mitocôndria durante a divisão celular (Gull, 1999).

O retículo endoplasmático é encontrado ao longo do corpo do *T. cruzi*, podendo estar ligado aos microtúbulos subpeliculares. O Golgi é único nos tripanosomatídeos e está localizado na porção anterior do corpo do parasito próximo a bolsa flagelar. Assim, como em outros eucariotos, participa do

processo de glicosilação. Os ribossomos estão distribuídos por todo o citoplasma (revisto em De Souza, 1984).

Os acidocalcisomos são organelas ácidas, esféricas e eletrodensas presentes em todas as formas evolutivas do parasito, variando em número e sutilmente em conteúdo. Scott & Docampo (1997) avaliaram o conteúdo dos acidocalcisomos de epimastigotas de *T. cruzi* e encontraram altas concentrações de fósforo, magnésio, cálcio, sódio e zinco. A membrana do acidocalcisomo apresenta bombas H^+ -ATPase e H^+ -pirofosfatase (H^+ -PPase), trocadores Ca^+/H^+ e Na^+/H^+ , canais de Ca^{+2} -ATPase e aquaporina, entretanto os transportadores dos demais íons armazenados ainda não foram descritos (revisto em Docampo et al., 2005; Moreno & Docampo, 2009). Além de armazenar íons, os acidocalcisomos parecem desempenhar papel como fonte secundária de energia através do metabolismo de polifosfato e participar na homeostase de pH intracelular em tripanosomatídeos (Lemecier et al., 2002; Docampo et al., 2005). Recentemente, foi demonstrada a participação dos acidocalcisomos juntamente com os vacúolos contráteis na osmoregulação (Rohloff & DoCampo, 2008; DoCampo et al., 2010). Os vacúolos contráteis são túbulos e/ou vesículas localizados próximo à bolsa flagelar cuja função envolve controlar o volume celular em situação de estresse hiposmótico. Em 2011, foi realizado o sub-proteoma dos vacúolos contráteis do parasito visando melhor estabelecer os mecanismos funcionais dessa organela (Ulrich et al., 2011).

Os glicosomos são organelas esféricas de matriz densa, envoltas por uma única membrana, estando presentes apenas em tripanosomatídeos. Dentro desta organela, encontram-se as enzimas responsáveis pelas etapas iniciais da via glicolítica, sendo observado em *Trypanosoma brucei* alterações nos níveis de enzimas glicolíticas que ocorrem de acordo com o meio em que o parasito está inserido (Opperdoes & Borst, 1977; revisto em Parsons, 2004; De Souza, 2009), sendo a glicólise a principal fonte de ATP nas formas sanguíneas deste parasito. Os glicosomos são considerados um tipo específico de peroxisomo que, no caso do *T. cruzi*, não contém catalase. Essa organela contém enzimas para outros processos importantes como a via da pentose-fosfato, β -oxidação de ácidos graxos, via de biossíntese de pirimidina, entre outros (Michels et al., 2006).

O núcleo dos tripanosomatídeos é estruturalmente semelhante à de outros eucariotos. Quanto à morfologia, o núcleo é alongado em tripomastigotas e arredondado, nas formas amastigotas e epimastigotas. O envoltório nuclear é claramente contínuo com o retículo endoplasmático e o nucléolo é frequentemente observado na região central do núcleo (revisto em De Souza, 2002).

1.3. Doença de Chagas

1.3.1. Aspectos clínicos

O sítio de entrada do parasito no hospedeiro pode ser identificado por uma lesão de pele denominada chagoma de inoculação. No caso da contaminação pela conjuntiva ocular, esta lesão é denominada sinal de Romana (Figura 1.4). Após a infecção, observa-se um curto período de incubação (7 a 10 dias), iniciando-se então a fase aguda da doença. Cerca de 95% dos casos, são oligossintomáticos. Esta fase está relacionada a alta parasitemia e presença de infiltrados inflamatórios em diferentes tecidos podendo causar uma cardiopatia difusa (revisto em Malta, 1996). Quando sintomática, a fase clínica aguda caracteriza-se por febre, sonolência, mal estar, cólicas e diarreias, edemas e distúrbios respiratórios. Apenas uma pequena parte dos pacientes na fase aguda (5%), geralmente na classe de risco (crianças de até 2 anos de idade e imunossuprimidos) vão a óbito por miocardite ou meningoencefalite, com possíveis complicações como broncopneumonia (Torrice et al., 2004; revisto em Rassi Jr et al., 2010). A grande maioria dos casos agudos não tratados evolui para a forma indeterminada da doença (estado de latência). Esta fase consiste na presença de infecção (revelada por sorologia e/ou métodos parasitológicos indiretos) associada à ausência de sintomatologia e a exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos de coração, esôfago e cólon normais. Frente a uma resposta imunológica eficiente, a maioria dos indivíduos infectados permanece nesta forma assintomática por toda a vida. Porém, de 10-20 anos após a infecção, cerca de 20-40% dos casos evoluem para a fase crônica sintomática, cujas principais manifestações são as alterações cardíacas (20-30%), e/ou digestivas (10%) (revisto em Rassi Jr et al., 2010), sendo difícil

prever quais indivíduos irão evoluir para esta fase (revisto em Marin-Neto e Rassi Jr, 2009).

Nesta fase, apesar da parasitemia muito baixa ou quase indetectável, observa-se intenso processo inflamatório, afetando diversos órgãos (revisto em Campos de Carvalho et al., 2009). Entre os pacientes chagásicos crônicos sintomáticos, a grande maioria (aproximadamente 30%) tem dano cardíaco progressivo, caracterizado por aneurisma apical, arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca progressiva, podendo ocorrer ainda morte súbita (Higuchi et al., 2003; Rassi Jr et al., 2006). Outros 6-10% dos pacientes infectados apresentam comprometimento digestivo caracterizado por alterações da secreção, motilidade, absorção e, nos casos mais graves, pelo aparecimento de megavísceras (esôfago e cólon). Cerca de 3% dos pacientes chagásicos desenvolvem lesões neurológicas periféricas, principalmente meningoencefalites (Higuchi et al., 2003; Rassi Jr et al., 2009; OMS, 2010).



Figura 1.4. Paciente apresentando Sinal de Romaña (Teixeira et al., 1978).

A reativação da doença de Chagas resulta em alta parasitemia e diversas manifestações clínicas cardíacas (como miocardite), nervosas (meningoencefalite) e lesões cutâneas, sendo os casos de reativação observados em pacientes imunocomprometidos, como portadores do vírus HIV ou transplantados (Bern et al., 2007; revisto em Paker & Sethi, 2011).

1.3.2. Aspectos epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 21 países da América Latina são endêmicos para doença de Chagas, existindo cerca de 10 milhões de pessoas infectadas no mundo. Em áreas endêmicas cerca de 25 milhões de indivíduos se encontram sob risco de infecção, tendo sido estimado em 2008 que mais de 10.000 pessoas morreram devido a esta doença (OMS, 2010). No entanto, acredita-se que estes números estejam subestimados e que existam cerca de 100 milhões de pessoas sob risco de infecção e que 14.000 portadores da doença morram por ano (DNDi, 2012a). Em áreas endêmicas, segundo Rassi Jr e colaboradores (2009, 2010), a doença de Chagas é a maior causa de cardiomiopatia e a principal responsável por morte em pacientes com doenças cardiovasculares com idade entre 30-50 anos.

A principal via de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, seguida, pela via transfusional, por transplante de órgãos, e ainda a via oral que será abordada no item seguinte (Altclas et al., 2008; Campos et al., 2008; revisto em Dias et al., 2011). Além disso, mulheres grávidas infectadas podem transmitir *T. cruzi* resultando na doença congênita e, apesar de rara ocorrência, a amamentação também pode ser considerada uma via de transmissão (Bittencourt, 1988; Rassi et al., 2004; revisto em Dias et al., 2011).

1.3.2.1. Transmissão oral e na Amazônia

A via oral de infecção tem apresentado uma importância crescente, envolvendo a ingestão de alimentos contaminados com urina e fezes de triatomíneos infectados em áreas onde o ciclo domiciliar do triatomíneo estava sob controle (revisto em Dias et al., 2011; Andrade et al., 2011; Kocher et al., 2012; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). Anualmente, vários surtos micro-epidêmicos decorrentes de contaminação oral são registrados pelo Ministério da Saúde: em Teutônia (Rio Grande do Sul), Catolé do Rocha (Paraíba), Belém (Pará), Redenção (Ceará) e Navegantes (Santa Catarina) (Silva et al., 1968; Shikanai-Yasuda et al., 1991; Steindel et al., 2008; Andrade et al. 2011), dentre outros. Segundo Shikanai-Yasuda & Carvalho (2012) o aumento de surtos da doença associados à transmissão oral pode ser em parte atribuído ao melhor

reconhecimento da doença, a uma maior vigilância, à falta de boas práticas no processamento de alimentos e ainda, a mudanças ambientais com aumento das taxas de infecção em triatomíneos em ectópos próximas a residências.

A doença de Chagas na região Amazônica, nas palavras de Coura & Junqueira (2012), pode ser considerada uma doença enzoótica de animais selvagens ou uma antropozoonose, uma doença acidental quando os homens penetram em um ecossistema selvagem ou quando triatomíneos selvagens invadem domicílios atraídos por luz ou a procura de alimentos. Assim casos agudos da doença nesta região ocorrem principalmente por transmissão oral, enquanto aqueles de transmissão vetorial estão relacionados a atividades agrícolas ou quando os indivíduos entram na mata (revisto em Coura & Junqueira, 2012).

Em 1969, Shaw e colaboradores descreveram um surto envolvendo quatro casos de infecção em Belém associado à transmissão oral. Entre 2000-2010 mais de 1000 casos da doença de Chagas aguda foram relatados em 138 surtos, principalmente na Amazônia brasileira, sendo 776 atribuídos à ingestão de alimentos/bebidas (Shikanai-Yasuda & Carvalho 2012). Na região Amazônica, a epidemiologia da doença de Chagas é difícil de ser estimada devido a diversidade de vetores e reservatórios selvagens, migração humana e aumento do desmatamento (revisto em Lescure et al., 2010). Pelo menos 27 espécies de 9 gêneros de triatomíneos já foram encontradas na Amazônia e a maioria delas, estão infectadas com *T. cruzi* (revisto em Coura & Junqueira, 2012). Estes autores associam o risco da endemicidade da doença de Chagas na região aos seguintes fatores: (a) desmatamento progressivo associado com deslocamento de animais selvagens, fontes naturais de sangue para triatomíneos; (b) adaptação de triatomíneos selvagens a habitações humanas devido à necessidade de fonte de alimento, (c) aumento da migração de pessoas vindos de áreas endêmicas para a Amazônia, atraídos pela construção de novas hidrelétricas, exploração de petróleo e gás e outras atividades de trabalho.

1.3.2.2. Globalização da doença de Chagas

A doença de Chagas está emergindo em países não endêmicos associada às transmissões sanguínea, congênita e por transplante de órgãos.

A depender do país de origem e o de residência de imigrantes estima-se que as taxas de infecção variam entre 1% e 26% (**Figura 1.5**) (Coura & Dias, 2009; Gascon et al., 2010; Schmunis & Yadon, 2010). O primeiro relato de doença de Chagas na Europa foi o de Pehrson e colaboradores (1981) apresentando o caso de um menino de 5 anos, assintomático, nascido na Romênia em 1975 e que nunca tinha saído do país. A partir de então, publicações esporádicas começaram a apontar para a globalização desta doença (Schmunis, 2007). Em 2007, iniciativas da OMS e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) foram direcionadas para a doença de Chagas na Europa. Em maio de 2010, a Assembléia da OMS aprovou resolução (WHA63.20) reconhecendo o aumento de casos da doença em países não endêmicos, acentuando que todas as possíveis vias de transmissão necessitavam de monitoramento e que pacientes com as formas aguda e crônica deveriam ser integrados nos serviços de saúde básicos (Viñas & Jannin, 2011).

Nos Estados Unidos aproximadamente 300.000 indivíduos estão infectados com *T. cruzi* (Bern & Montgomery, 2009; Schmunis & Yadon, 2010). Gürtler e colaboradores (2007) relatam a existência, em algumas regiões dos Estados Unidos, de uma alta incidência de animais infectados, se comparada a algumas áreas endêmicas da América Latina. Nos Estados Unidos a triagem em bancos de sangue ocorre de forma opcional não sendo exigida pela agência Food and Drug Administration (FDA) (revisto em Bern, 2011).

Na Europa, no período 1999-2009, as estimativas são de mais de 80.000 pessoas infectadas com cerca de 4.000 casos confirmados em laboratório (OMS, 2010). Os países mais afetados são Espanha, Reino Unido, Itália e Suíça (Perez-Molina et al., 2011). Na Itália, o país, depois da Espanha com maior número de residentes originários América Latina, em uma triagem realizada no período 1998-2010 dentre 867 pessoas sob risco, 4.2% apresentaram sorologia positiva para a doença de Chagas, e dentre 214 mulheres grávidas, três estavam infectadas (Angheben et al., 2011). Na Suíça, com uma estimativa de cerca de 60.000 imigrantes da América Latina, casos de doença de Chagas têm sido reportados desde 1979, sendo que em junho de 2011, 258 casos foram diagnosticados, a maioria adultos na fase indeterminada (Jackson & Chapuis, 2011). A rede EuroTravNet apresentou

estudo do período entre 2008 e 2009, descrevendo as características dos pacientes crônicos residentes na Europa: de 13.349 pessoas que participaram de uma triagem de saúde associada a viagens e migração, 124 (122 na Espanha, 2 na Suíça) tinham a doença crônica, sendo 96% nascidos na Bolívia e com tempo de residência na Europa, principalmente na Espanha, de 38 meses e com média de idade 35 anos sendo 65% mulheres (Perez-Molina et al., 2011). Esta rede foi fundada em 2008 visando assistir, na área de monitoramento de doenças associadas a viagens ao “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC).

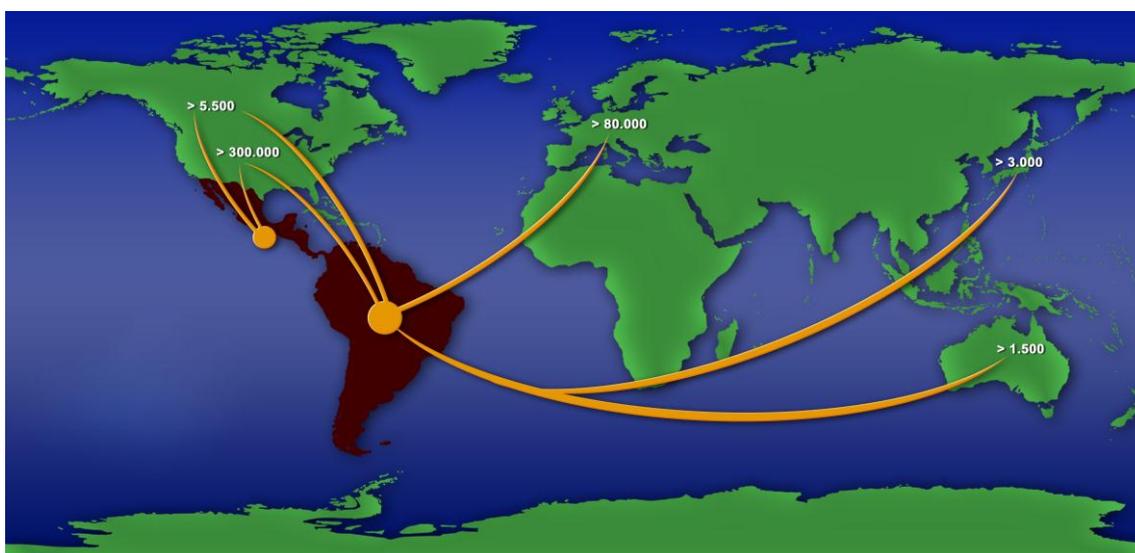


Figura 1.5. Principais rotas de imigrantes da América Latina para países não endêmicos. Os valores representam a estimativa do número de imigrantes infectados (Adaptado de Coura & Viñas, 2010).

1.3.2.3. Profilaxia da doença de Chagas

Criado em 1991, o acordo dos países do cone sul da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), apoiado pela OMS, visou principalmente controlar os vetores da doença de Chagas. Graças a esta iniciativa, o percentual de novas infecções reduziu 70%, sendo essa redução devida à interrupção da transmissão através de vetores e por transfusão sanguínea no Uruguai (1997), Chile (1999) e Brasil (2006) (Mocayo & Silveira, 2009; revisto em Parker & Sethi, 2011). Essa expressiva redução pode ser

explicada pela diminuição no número de capturas de *T. infestans* nos domicílios (Moncayo & Ortiz-Yanine, 2006). A interrupção da transmissão vetorial foi confirmada por testes sorológicos que revelaram a soroprevalência de 0% em crianças de 0-5 anos em 2007 (Moncayo & Silvera, 2009). No entanto, em parte dos países da América Latina, como na Bolívia e México, as taxas de infecção humana por *T. cruzi* ainda são altas (revisto em Coura & Viñas, 2010).

Segundo Reithinger e colaboradores (2009), esforços para eliminação da doença de Chagas fora do Cone Sul esbarram na resistência a inseticidas, recolonização de insetos após aplicação dos mesmos, abastecimento insuficiente de drogas tripanocidas, falta de consenso quanto ao tratamento de pacientes crônicos, ausência de padrões internacionais para diagnóstico e ausência de uma vacina efetiva.

As políticas preventivas da transmissão da doença de Chagas se baseiam em três pontos principais: (a) eliminação do inseto vetor, através de inseticidas; (b) triagem de doadores de banco de sangue e/ou esterilização do sangue utilizado; e (c) melhoria das moradias (**Figura 1.6**) (que comumente servem de ninhos para os triatomíneos) e programas de educação sanitária e profilática (revisto em Dias, 2008).

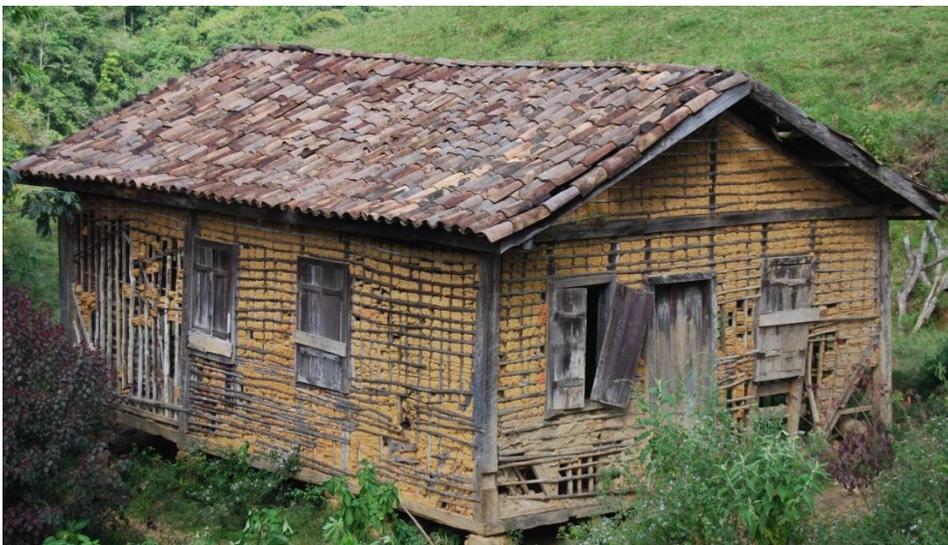


Figura 1.6. As casas de pau a pique podem abrigar triatomíneos.

Fonte: Rubem Menna-Barreto.

1.3.3. Tratamento

Desenvolvidas entre as décadas de 60 e 70, as drogas utilizadas para o tratamento da doença de Chagas são o benznidazol (Bz) (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) e o nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (**Figura 1.7**).

O nifurtimox teve sua produção interrompida pela Bayer, por questões de demanda, nos anos 80 no Brasil e em 1997 na Argentina. Devido a ensaios clínicos mostrando sua atividade em combinação com outras drogas no tratamento da infecção causada por *Trypanosoma gambiense*, sua produção foi reiniciada em 2000 no complexo de Ilopango Bayer em El Salvador (Jannin & Villa, 2007). Recentemente, o nifurtimox foi aprovado para o uso combinado com eflornitina no tratamento da doença no Oeste Africano causada por *T. brucei gambiense* (Priotto et al., 2009). Atualmente em um acordo entre a Bayer Healthcare e a OMS, a produção de nifurtimox (distribuição gratuita) foi garantida para utilização na América Latina até o presente ano (Bayer Healthcare, 2012), estando disponível em 12 países do continente africano desde 2009 (revisto em Burri, 2010; DNDi,2012a).

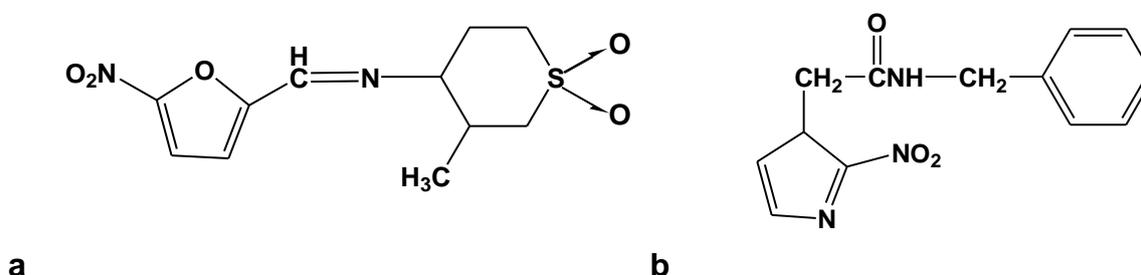


Figura 1.7. Drogas utilizadas no tratamento clínico da doença de Chagas.

(a) Nifurtimox; (b) Benznidazol

Em 2003, a empresa suíça Roche (Basileia), fabricante mundial do benznidazol, iniciou processo de transferência de tecnologia do medicamento para o governo brasileiro ficando o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) o responsável pela sua produção no Brasil (Jannin & Villa, 2007). O produto foi registrado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como um “medicamento novo” em novembro de

2006. Até 2011, toda a sua produção foi realizada utilizando o princípio ativo fabricado pela Roche, quando então, a empresa brasileira Nortec Química passou a ser a responsável. Como a produção da matéria prima não foi suficiente houve uma interrupção no fornecimento do material a partir de agosto de 2011 (Moção, 2011; MSF, 2011; Manne et al., 2012). Recentemente, o LAFEPE retomou a produção e distribuição do benznidazol em janeiro de 2012 (comunicação pessoal, 15/05/2012). Em parceria com DNDi, o LAFEPE desenvolveu uma formulação pediátrica do medicamento (12,5 mg) que em dezembro de 2011 recebeu o registro da ANVISA (Lafete, 2012; DNDi, 2012b).

O benznidazol tem eficácia comprovada na fase aguda da doença e é considerado o tratamento de primeira linha para todos os indivíduos infectados com *T. cruzi*, exceto mulheres gestantes (Coura & Borges-Pereira, 2011). Atualmente existem evidências de que o tratamento de pacientes crônicos, com sintomas cardiovasculares leves, pode levar ao retardo/prevenção na progressão da doença pela redução ou eliminação da carga parasitária (Viotti et al., 2006; Bern, 2011; Coura & Borges-Pereira, 2011; Nagajyothi et al., 2012). Segundo Coura & Borges-Pereira (2011) pacientes crônicos com cardiopatia grau II (New York Heart Association) devem ser tratados com quimioterapia específica e grau III tratados a depender da decisão médico-paciente. Estes autores propõem tratamentos de curto prazo (30 dias) com intervalos de 30-60 dias por um período de 6 a 12 meses e a combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação benznidazol + nifurtimox, benznidazol ou nifurtimox + alopurinol ou triazóis antifúngicos que agem na inibição da síntese de esteróis. Estão sendo aguardados os resultados quantitativos do projeto multicêntrico BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) que compara os efeitos de benznidazol e placebo em portadores da doença na América Latina (Marin-Neto et al., 2008; MSF, 2011). Atualmente, MSF está realizando estudos para fazer a triagem de mais de 80.000 pessoas na Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Paraguai, tendo diagnosticado mais de 6.000 pessoas e tratado mais de 4.000 (2011).

O mecanismo de ação de nifurtimox envolve redução metabólica do grupo nitro por nitroreduases gerando radicais livres que reagem com oxigênio

produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) (revisto em Docampo & Moreno, 1986). O *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxicação de ERO, apresentando basicamente a enzima tripanotiona redutase (TR) e baixa atividade da superóxido dismutase; sendo deste modo, mais sensível a ERO que a célula hospedeira (Boveris et al., 1980; Morello, 1988; revisto em Maya et al., 2007).

O mecanismo de ação do benznidazol parece estar relacionado à nitroredução de componentes do parasito (Polak & Richle, 1978) e a ligação de metabólitos ao DNA nuclear, ao kDNA de *T. cruzi* e a lipídeos e proteínas do parasito (Diaz de Toranzo et al., 1988). Segundo o grupo de Wilkinson nifurtimox e benznidazol agiriam como pró-drogas através da ativação de uma nitroredutase tipo I (NTR) presente em *T. brucei* e em *T. cruzi*, ausente em células de mamífero. Essa enzima cataliza a redução de elétrons tipo 2 por compostos nitroheterocíclicos formando hidroquinona e levando à produção de metabólitos tóxicos, sem produção significativa de superóxido (Hall et al., 2012; Wilkinson et al., 2011; Hall & Wilkinson, 2012).

Tanto benznidazol quanto nifurtimox causam efeitos colaterais graves. Dentre os efeitos do nifurtimox estão anorexia, perda de peso, excitabilidade psíquica ou sonolência e manifestações digestivas. Já o tratamento com benznidazol acarreta dermatite por hipersensibilidade e intolerância digestiva, podendo ainda levar a depressão da medula óssea (neutropenia, agranulocitose e trombocitopenia), polineurites e toxicidade hepática (Viotti et al., 2009).

Como ainda não há outro composto que tenha completado todas as fases clínicas de testes mais avançadas, benznidazol e nifurtimox se estabelecem como a única opção de quimioterapia. No entanto, ambos estão longe de serem considerados compostos ideais para o tratamento da doença de Chagas devido a: (a) controversa eficácia na fase crônica; (b) seus sérios efeitos colaterais; (c) longo período de tratamento; (d) ação variável de acordo com a susceptibilidade de diferentes cepas de parasitos; e (e) baixa acessibilidade dos pacientes às drogas (Filardi & Brener, 1987; revisto em Coura, 2009; De Castro et al., 2011).

Como já dito anteriormente, é crescente a necessidade de triagem para *T. cruzi* nos bancos de sangue de países endêmicos e não endêmicos. Há muitos anos, a única terapia disponível refere-se ao corante derivado de trifenilmetano violeta de genciana (ou cristal de violeta), que teve sua atividade caracterizada sobre tripomastigotas sanguíneos *in vitro* e seu uso liberado para tratamento das bolsas de sangue. No entanto, a coloração do sangue e o longo tempo de incubação são fatores que restringem o uso deste composto (Morello, 1988). Muitas vezes a infraestrutura dos hospitais das localidades endêmicas não permite o estoque adequado das bolsas de sangue, além da substância poder causar rejeição dos pacientes devido à coloração. Essa limitação do tratamento de bolsas de sangue faz com que estas sejam muitas vezes descartadas no caso de diagnóstico positivo. Dessa forma, torna-se essencial novas alternativas que aumentem a eficácia e eficiência do tratamento dos bancos de sangue.

1.3.4. Perspectivas para novos quimioterápicos

Esforços contínuos têm sido realizados devido às limitações do tratamento atual para doença de Chagas, justificando a procura por novas drogas que possam substituir ou possam ser administradas em combinação com nifurtimox e benznidazol e/ou serem utilizadas no caso de falhas terapêuticas. A indústria farmacêutica tem pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos para doença de Chagas devido ao alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento (Mocayo & Yanine, 2006). A indefinição de critérios de cura da doença dificulta a introdução de novos quimioterápicos. O único critério aceito atualmente é a cura parasitológica, constatado pelo teste de sorologia negativa, o que pode levar alguns anos após o fim do tratamento (revisto em Lescure et al., 2010).

Na busca de novas drogas, diversas vias metabólicas do parasito têm sido investigadas como possíveis alvos terapêuticos, incluindo a biossíntese de ergosterol, metabolismo de tripanotona, cisteína protease, metabolismo de pirofosfato, síntese de proteínas ou DNA. A combinação de diferentes compostos visando uma maior eficácia e menor toxicidade também é uma estratégia terapêutica usada com frequência (revisto em Coura, 2009). Dentre

as características essenciais que um novo composto anti-*T. cruzi* necessita estão: (a) alta atividade contra tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares; (b) alta atividade contra diversas cepas de *T. cruzi*; (c) atividade comprovada nas fases aguda e crônica da doença; (d) tratamento por administração oral e preferencialmente com poucas doses; (e) baixa toxicidade ao paciente, sendo o medicamento disponível a crianças, adultos e mulheres em fase reprodutiva; e (f) estabilidade (resistência a variações de temperatura, por exemplo) e baixo custo de produção e comercialização (Nwaka & Hudson, 2006). Na **Tabela 1.1** estão descritos os mecanismos de ação das principais drogas contra a doença de Chagas.

Tabela 1.1. Principais drogas contra a doença de Chagas e seus mecanismos de ação sugeridos

Droga	Uso	Mecanismo de ação
Benznidazol	Tratamento de primeira linha para a fase aguda	Nitroredução de macromoléculas do parasito e danos no DNA
Nifurtimox	Tratamento combinado a eflornitina para tripanosomíase africana	Nitroredução de macromoléculas do parasito e geração de ERO
Posoconazol	Anti-fúngico com possibilidade de uso em todas as fases da doença	Inibidores da biosíntese de ergosterol
Pró-droga Ravuconazol (E1224)	Uso ainda não aprovado para o tratamento da doença	Inibidores da biosíntese de ergosterol
Amiodarona	Tratamento de arritmia cardíaca em pacientes crônicos	Inibição da homeostase de cálcio do parasito e da biossíntese de ergosterol

Adaptado de Clayton, 2010.

O efeito tripanocida do posoconazol (SCH 56592 Schering-Plouch), inclusive em cepas resistentes a benznidazol (Molina et al., 2000), está relacionado a inibição da enzima 14 α -demetilase (CYP51), interferindo na biossíntese de ergosterol (Buckner & Navabi, 2010). Estudos clínicos de fase II com posoconazol estão sendo iniciados na Espanha para tratar pacientes

crônicos (Clinical Trials, 2012a). Apesar de seguro em administração oral (fase I de testes), o alto custo do antifúngico pode ser um fator limitante para o uso deste medicamento no tratamento da doença (Courtney et al., 2003; De Castro et al., 2011). Benain e colaboradores (2006) demonstraram o efeito sinérgico de amiodarona (composto anti-arrítmico indicado a pacientes chagásicos sintomáticos) e posoconazol contra *T. cruzi* em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Na Bolívia, iniciou-se em 2011 os estudos de fase II em pacientes crônicos para avaliar a eficácia e segurança do E1224, uma pró-droga do ravuconazol. Assim como E1224, diversos antifúngicos derivados de triazol já foram testados em modelos animais para doença de Chagas: ravuconazol, posoconazol, albaconazol, D08701 e Tak-187. A atividade tripanocida destes compostos está associada à inibição da biossíntese de ergosterol, essencial para crescimento e sobrevivência do parasito (Clinical Trials, 2012b). Como opção terapêutica, o uso de células-tronco com capacidade de auto-duplicação e diferenciação também tem sido explorado para reparo de lesões (principalmente cardíacas) em pacientes com a doença crônica em estágio avançado (Campos de Carvalho et al., 2009).

1.4. Naftoquinonas

Quinonas são dienonas cíclicas cujas características químicas propiciam a formação de ligações covalentes com alvos biológicos e a transferência de elétrons em reações de oxido-redução. Após a redução das quinonas são formadas semi-quinonas que, por serem instáveis, tendem a retornar à sua formação original ao transferir seus elétrons livres a uma molécula ou radical acceptor que quando é o oxigênio leva a geração dos EROs ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (**Figura 1.8**) (revisto em Kumagai et al., 2012). A alta citotoxicidade desses compostos está relacionada ao estímulo de estresse oxidativo e alquilação de proteínas e ácidos nucleicos (Boveris et al., 1980).

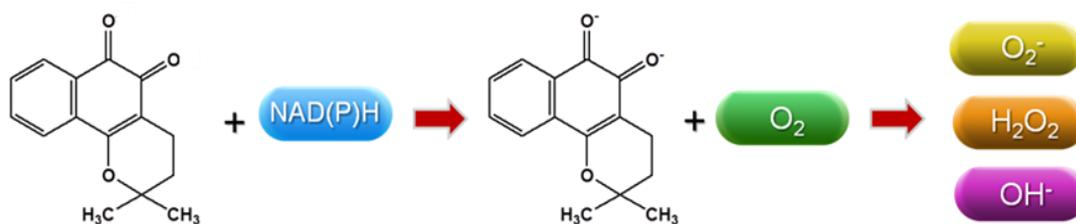


Figura 1.8. Mecanismo geral de ação de quinonas e produção de EROs (Menna-Barreto, 2008).

Dentre as quinonas encontram-se as naftoquinonas (**Figura 1.9**), presentes em diferentes famílias de plantas e que têm sido utilizadas em diversas culturas como corantes em cosméticos e alimentos, além de ter aplicação na medicina, como agentes anti-tumorais, anti-inflamatórios e anti-microbianos (Powis, 1987). A toxicidade de naftoquinonas tem sido bastante estudada *in vitro* (Brunmark & Cadenas, 1989; Comporti, 1989; O'Brien, 1991) e *in vivo* (Munday 2000, 2001, 2004).

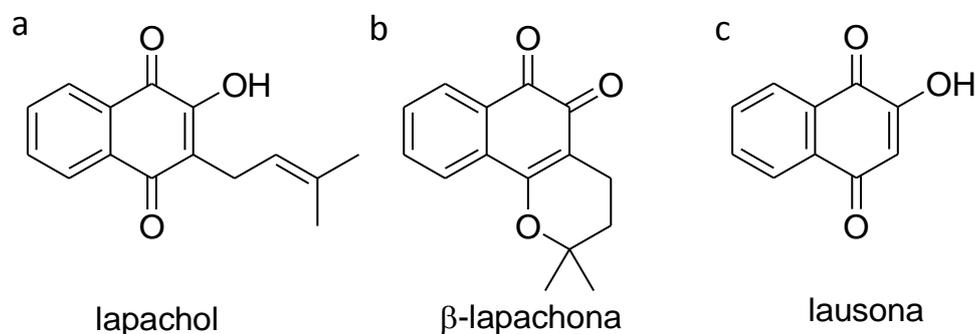


Figura 1.9. Estrutura química das naftoquinonas: (a) lapachol; (b) β-lapachona; e (c) lausona.

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-but-2-en-1-il)-1,4-naftoquinona) é uma naftoquinona extraída do lenho de diferentes espécies de *Tabebuia* (do tupi, pau ou madeira que flutua) da família bignoniaceae, como por exemplo, o pau d'arco ou ipês (**Figura 1.10**). Essa naftoquinona despertou grande interesse por suas características farmacológicas e por ser de fácil obtenção do lenho de

madeiras destas plantas, variando a quantidade isolada entre 1 e 4%. Essas plantas são facilmente encontradas nas florestas tropicais em quase todo o território brasileiro, e ainda nas regiões do cerrado e na caatinga. Na medicina popular, principalmente entre as populações indígenas da América, ipês são utilizados no tratamento de diversas doenças, inclusive câncer (Bastien et al., 1983; Arenas, 1987). Dentre as características químicas do lapachol, está a facilidade de ciclização da cadeia isoprenil levando à formação da α -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[2,3-*b*]piran,5,6-diona) e β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-*b*]piran,5,6-diona).



Figura 1.10. *Tabebuia* sp., vulgarmente conhecida como Ipês das quais é obtido o lapachol. Fonte: Ferreira et al., 2010.

Os primeiros relatos da atividade biológica de lapachol iniciaram na década de 60, tendo sido observadas ação antifúngica, bactericida, neoplásica, leishmanicida, moluscicida, antiviral, antiinflamatória, apoptótica e neoplásica (De Almeida et al., 1990; Sacau et al., 2003; Lima et al., 2004; De Souza et al., 2008; Maia et al., 2011).

A β -lapachona se destaca por apresentar conhecida atividade antiviral, citotóxica para células tumorais e apoptóticas (revisto em Ferreira et al., 2010). Esta naftoquinona inibe a atividade da transcriptase reversa nos vírus causadores da mieloblastose em aves, da leucemia Rauscher em camundongos e a transcrição do vírus HIV-1 (Schürch & Wehrli, 1978; Li et al., 1993). As atividades antivirais e apoptóticas podem estar relacionadas ao efeito

inibidor específico de topoisomerasas envolvidas em processos como replicação, transcrição, mitose e reparo (revisto em Pinto & De Castro, 2009; De Castro et al., 2011). A β -lapachona encontra-se em testes clínicos de fase II para tratamento do câncer de pâncreas, sinergicamente ao gencitabina, quimioterápico já utilizado para o tratamento desta neoplasia (Clinical Trials, 2012c).

A lausona é uma naftoquinona obtida de plantas da família lythraceae, principalmente das folhas de *Lawsonia alba*, *L. inermis* e *Impatiens balsamina* representando cerca de 1 a 1,4%. Estas plantas são comuns em regiões tropicais da Ásia, África e América. No Antigo Egito, há cerca de 4.000 anos, o extrato de folhas de *L. inermis*, rico em lausona, era utilizado para tingir cabelos, unhas e pele. Na medicina popular, a lausona é empregada no tratamento de micoses e feridas (revisto em Ferreira et al., 2010), principalmente aquelas causadas por fungos. O mecanismo de ação desta naftoquinona envolve estresse oxidativo, tendo sido descrita ação microbicida e moluscida (Camara et al., 2008; Klaus et al., 2010).

Vários autores mostraram correlação entre a estrutura da quinona e seu efeito tóxico em tripomastigotas sanguíneos, sendo as naftoquinonas do tipo 1,2 mais ativas que as do tipo 1,4 (Lopes et al., 1978; Goijman & Stoppani, 1985; Pinto et al., 1987; Goulart et al., 1997). Seu mecanismo de ação sobre tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi*, está ligado a sua característica de participar de reações redox e gerar radicais livres de oxigênio (Boveris et al., 1978; Cruz et al., 1978; Docampo et al., 1978a; Molina Portela et al., 1996).

A atividade de várias naftoquinonas foi testada sobre epimastigotas de *T. cruzi*, sendo que β -lapachona e alil- β -lapachona inibiram a proliferação sendo cerca de 10x mais ativas que o lapachol, enquanto α -lapachona apresentou baixa atividade (Lopes et al., 1978). O tratamento de epimastigotas com β -lapachona levou a geração de radicais livres e a inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos, induzindo ainda fragmentação do DNA nuclear e de cinetoplasto (Goijman & Stoppani, 1985; Goijman et al., 1985). Em homogenato total e em fração mitocondrial de epimastigotas foi observada a geração de água oxigenada na presença de β -lapachona, o que não ocorreu com a α -lapachona (Boveris et al., 1978; Cruz et al., 1978; Docampo et al.,

1978b). β -lapachona levou ainda a alterações ultraestruturais nas três formas do parasito: “blebs” na membrana plasmática com desaparecimento pontual dos microtúbulos subpeliculares; condensação da cromatina nuclear e inchaço da mitocôndria, além da redução respiratória e geração de ROS, especialmente peróxido de hidrogênio, indicando a susceptibilidade do parasito a naftoquinonas (Docampo et al., 1977; 1978a; Boveris et al., 1978; Cruz et al., 1978).

Mais recentemente, Menna-Barreto e colaboradores (2009a) demonstraram que as naftofuranoquinonas derivadas de C-alil-lausona levaram a danos celulares semelhantes como inchaço mitocondrial e formação de “blebs” na membrana plasmática, além da formação de estruturas membranares atípicas, sugerindo uma participação do processo autofágico em epimastigotas. Com relação aos tripomastigotas sanguíneos, os autores verificaram que estes compostos induziram o aparecimento de vesículas dentro da mitocôndria e inchaço da organela, aumento da vacuolização citoplasmática e dilatação do envelope nuclear. Além disso, a atividade dos complexos mitocondriais I-III foi parcialmente bloqueada em ambas as formas do parasito pelas naftofuranoquinonas, sugerindo o comprometimento do transporte de elétrons, reduzindo o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e conseqüentemente as taxas respiratórias, além de acarretar um aumento na produção de EROs.

Dentre os derivados de β -lapachona, destacam-se os naftoimidazóis N1, N2 e N3 que demonstraram atividade tripanocida sobre as três formas do parasito, inibindo mais de 90% a infecção de macrófagos *in vitro* (Menna-Barreto et al., 2005, 2007). O tratamento com esses derivados levou a alterações na mitocôndria, na região do trans Golgi e desorganização de reservosomos, além de fragmentação de DNA em tripomastigotas. O principal alvo desses compostos no parasito foi a mitocôndria, sendo a maior parte das proteínas moduladas pelo tratamento com estes compostos (Menna-Barreto et al., 2010). O mecanismo de ação desses naftoimidazóis ainda não é totalmente conhecido, envolvendo a ativação da via autofágica e de proteínas Atgs (Menna-Barreto et al., 2009b,c).

Em animais experimentais, o pré-tratamento de tripomastigotas com β -lapachona levou a ausência de parasitemia detectável por exame microscópico e sobrevivência à infecção. Na presença de soro fetal bovino ou de solução de hemoglobina de coelho, com exceção dos ensaios com 3-alil- β -lapachona, este pré-tratamento não alterou o curso da infecção. Por espectrometria UV foi observado que a incubação de hemoglobina com quinonas, com exceção de 3-alil- β -lapachona, levava ao desaparecimento de oxihemoglobina e o aparecimento de metahemoglobina (Lopes et al., 1978). Resultado semelhante foi reportado em estudos com menadiona (derivado 1,4-naftoquinona), cuja ação sobre epimastigotas é abolida por soro ou sangue (Lopes et al., 1978). Esta transformação induzida por menadiona foi descrita como devida à geração de ânion superóxido (Goldberg & Stern, 1976). Estes resultados sugerem que estas quinonas sejam inativadas por redução na presença de oxihemoglobina ou pela interação com proteínas séricas. Estudos subseqüentes com 3-alil- β -lapachona mostraram em epimastigotas danos semelhantes aos apresentados por β -lapachona (Docampo et al., 1977), além de aumento na produção de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos, porém a droga foi inativa em infecções experimentais. Ainda sobre epimastigotas, uma naftofurandiona e uma quinolinfurandiona também mostraram atividade (Tapia et al., 2004).

Outros derivados de naftoquinonas também tiveram atividade sobre tripomastigotas avaliada, como as *orto*- e *para*-naftofuranoquinonas e *para*-naftopiranoquinona derivados de lapachol (Silva Jr et al., 2008a), as naftofuranoquinonas ligadas ao anel triazólico derivados de nor-lapachol (Silva Jr, 2008b) e as antraquinonas imidazólicas (Silva Jr et al., 2010). Deste grupo de naftoquinonas triazólicas testadas, a mais ativa foi a naftoquinona triazólica, 2,2-dimetil-3-(4-fenil-1,2,3-triazol-1-il)-2,3-dihidro-nafto[1,2-b]furano-4,5 diona (**NT**) (**Figura 1.11**). **NT** apresentou maior atividade que o composto padrão Bz nas mesmas condições experimentais (Silva Jr et al., 2008b), induzindo a uma melhor caracterização do mecanismo de ação desse composto, se constituindo como um dos objetivos da presente dissertação.

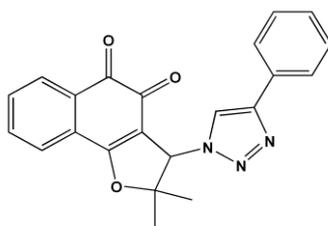


Figura 1.11. Estrutura química da naftoquinona triazólica.

1.5. Autofagia

A autofagia é um processo fisiológico e constitutivo, importante para o crescimento, sobrevivência e diferenciação de todas as células eucarióticas. Em condições normais, a autofagia é responsável pela degradação de agregados de proteínas e reciclagem de organelas, dentre outras funções (Yamada & Singh, 2012). As organelas ou porções do citoplasma a serem degradadas se encontram em uma vesícula de membrana dupla, denominada autofagossomo, que se funde aos lisossomos. Esse processo leva a degradação de proteínas, lipídeos e açúcares fornecendo energia para a célula sobreviver na falta de nutrientes e regulando o balanço entre biogênese e degradação de estruturas celulares (Yamada & Singh, 2012; Morita & Yoshimori, 2012). Embora a autofagia tenha sido inicialmente descrita em células de mamíferos, a maior parte dos estudos sobre o mecanismo molecular desse processo foi realizada em fungos (Weidberg et al., 2011). Esta via é conservada na maioria dos eucariotos, sendo mais de 30 genes *ATG* comuns a fungos e mamíferos, funcionais em etapas como indução da autofagia, formação do complexo de nucleação e autofagossomo, além de reconhecimento da carga a ser degradada (Yamada & Singh, 2012).

A via autofágica contribui para a sobrevivência celular em condições físico-químicas desfavoráveis como a escassez de nutrientes, hipóxia e altas temperaturas, sendo crucial no balanço entre anabolismo e catabolismo, com reciclagem de diversas estruturas celulares mesmo durante o desenvolvimento celular, entretanto o desbalanço desta via pode levar à morte celular (Reggiori & Klionsky, 2002; Shacka et al., 2008; Tung et al., 2012). Dessa forma, a autofagia ainda se mostra essencial na adaptação das células em resposta a estresse extra e intracelular (Rubinszfein et al., 2005; Mizushima et al., 2008).

Em células de mamíferos, a autofagia tem participação na diferenciação celular, remodelagem tecidual, mecanismo de defesa contra organismos patogênicos e pode estar associada tanto na promoção quanto na prevenção do câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Duszenko et al., 2011).

1.5.1. Histórico

Em 1955, o bioquímico belga Christian de Duve estudando hepatócitos de ratos, descobriu uma organela rica em hidrolases e a chamou de lisosomo (De Duve, 1955). Em 1963, De Duve descreveu pela primeira vez o termo “autofagia” para designar um processo no qual, porções do citosol são englobadas, formando vesículas de dupla membrana chamadas autofagosomos. Estas vesículas se fundem aos lisosomos, formando os autofagolisosomos onde ocorre a degradação do material por hidrolases (Brunchhaus et al., 2007). Desde sua descoberta até o final dos anos 90, a pesquisa na área de autofagia não apresentava grandes avanços até que, com a descrição dos mecanismos moleculares envolvidos, o interesse pela via autofágica cresceu exponencialmente, aumentando cinco vezes o número de publicações nesta área (Klionsky, 2007).

1.5.2. Tipos de autofagia

Existem duas diferentes vias de autofagia, uma via não seletiva induzida por falta de nutrientes e uma via seletiva, alvo específica. A autofagia não seletiva tem a função de fornecer energia pela degradação de proteínas, e a seletiva funciona para eliminar organelas e/ou macromoléculas em excesso ou desnecessárias da célula (Morita & Yoshimori, 2012). Dentre os tipos principais de autofagia estão: autofagia mediada por chaperona, microautofagia e macroautofagia, sendo última a mais comum (**Figura 1.12**).

1.5.2.1. Autofagia mediada por chaperona

Descrita até o momento somente em mamíferos, a autofagia mediada por chaperona (AMC) é uma forma seletiva de autofagia pelo qual apenas proteínas citosólicas específicas são transportadas através da membrana

lisosomal para degradação. Esta seletividade é realizada pela ligação de chaperonas em uma sequência de aminoácidos KFERQ da proteína a ser degradada, que não está acessível, quando estas se encontram em seu estado conformacional correto. Esse peptídeo sinal está presente em cerca de 30% das proteínas citosólicas das células de mamíferos entretanto, ainda existem outras sequências sinal relacionadas à AMC como QREFK e VDKFQ (Orenstein & Cuervo 2010; Li et al., 2011). Por fim, os substratos a serem degradados são reconhecidos no citoplasma por uma chaperona hsc70 que se liga a LAMP-2A na membrana lisosomal, translocando a proteína alvo para o interior dos lisosomos (Bejarano & Cuervo, 2010).

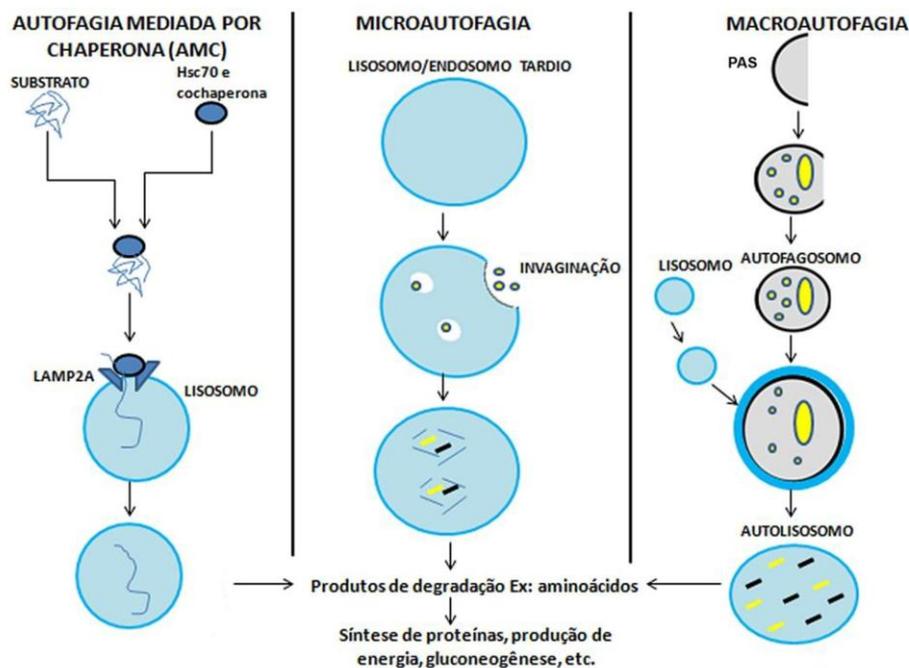


Figura 1.12. Formas de autofagia: autofagia mediada por chaperona, microautofagia e macroautofagia (Adaptado de Mizushima e Komatsu, 2011).

1.5.2.2. Microautofagia

A microautofagia ocorre através de invaginações na membrana lisosomal incorporando o material a ser degradado, podendo ser ou não seletiva. Dentre suas principais características morfológicas, destaca-se a presença de lisosomos multivesiculares, e apesar de originalmente descrita em

mamíferos, é amplamente estudada em fungos (Santambrogio & Cuervo, 2011; Li et al., 2012).

No estágio inicial da microautofagia, a superfície do lisosomo aumenta, surgindo uma cavidade dinâmica regulada pela GTPases Vps1p, sendo a frequência de formação dessas invaginações dependente das condições nutricionais (Li et al., 2012). Em um segundo momento, ocorre a especialização da invaginação, em uma forma tubular de diâmetro constante denominada tubo autofágico. Por fim, nanovesículas se desprendem desses tubos, se acumulando no interior dos lisosomos ou endosomos tardios (corpos multivesiculares) (Santambrogio & Cuervo 2011). A invaginação microautofágica participa da manutenção do tamanho das organelas e composição das membranas, demonstrando papel crucial no metabolismo lipídico (Sahu et al., 2011; Shpilka & Elazar, 2011; Li et al., 2012).

1.5.2.3. Macroautofagia

Também conhecida como autofagia clássica, a macroautofagia é historicamente um sistema não seletivo de degradação que envolve a formação dinâmica do autofagossomo com a participação de proteínas Atgs (**Figura 1.13**) (Ichimura & Komatsu, 2011). Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando evidências de macroautofagia seletiva de organelas como peroxissomos (pexofagia), núcleo (micronucleofagia) mitocôndria (mitofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia) e ribossomos (ribofagia), além de patógenos (xenofagia) (Farré et al., 2009; Johansen & Lamark, 2011; Youle & Narendra, 2011; Cebollero et al., 2012; Till et al., 2012; Yuk et al., 2012).

Em condições nutricionais satisfatórias, o complexo alvo de rapamicina mTor (*Target of rapamicin* em mamíferos) inibe a macroautofagia através da hiperfosforilação de Atg13. Já na escassez de nutrientes, ocorre a inativação da mTor e consequente indução de autofagia através da redução da fosforilação de Atg13, aumentando sua afinidade por Atg1. O complexo Atg1-Atg13 inicia a autofagia através da formação da estrutura pré-autofagosomal (PAS) a partir de projeções da membrana do retículo endoplasmático e/ou do Golgi com a participação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) classe III. A Atg9, o complexo ULK1-Atg13-FIP200 quinase, e o complexo Atg14-Vps34-beclina

PI3 quinase também participam do isolamento da PAS (He & Klionsky, 2009; Tanida, 2011).

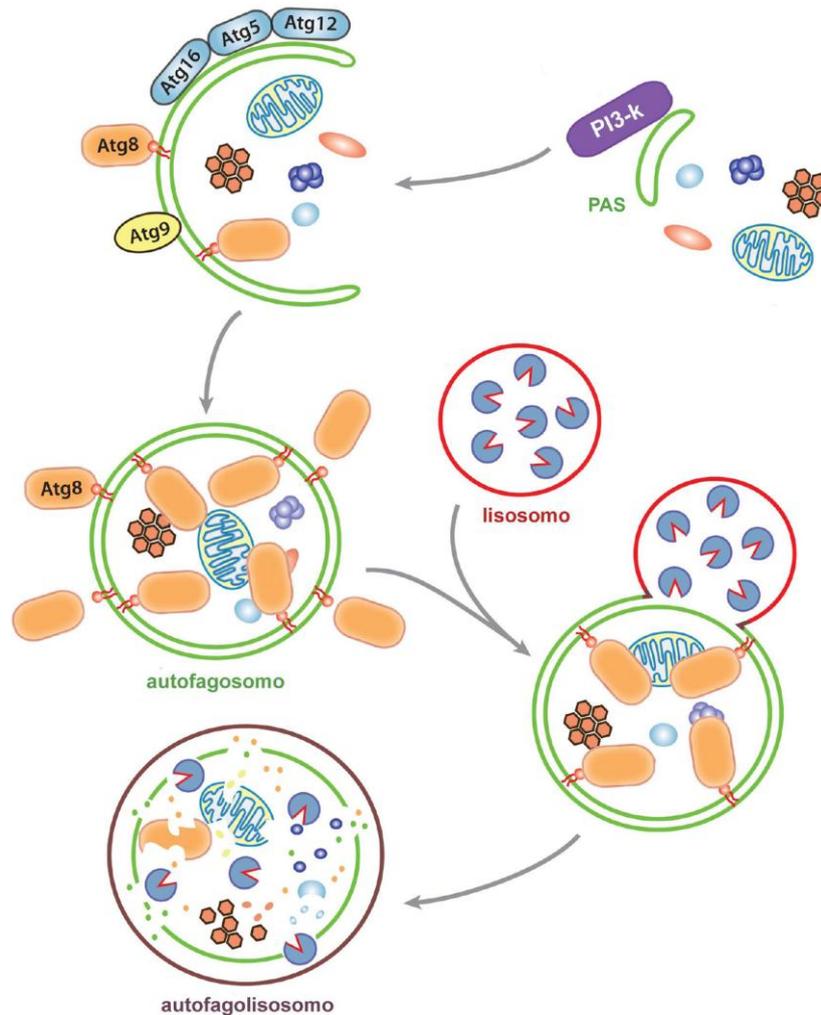


Figura 1.13. Representação esquemática da macroautofagia. A PI3K classe III induz a formação da PAS, englobando conteúdos citoplasmáticos como proteínas mal formadas e organelas defeituosas. O complexo Atg12-Atg5-Atg16, assim como a Atg8 conjugada a fosfatidiletanolamina são recrutadas pela PAS promovendo o alongamento dessa membrana. Após a formação do autofagossomo, este se funde ao lisosomo, constituindo o autofagolisosomo, onde seu conteúdo é degradado por hidrolases (Adaptado de He & Klionsky, 2009).

Em uma etapa seguinte, o alongamento da PAS pode ocorrer através de dois sistemas de conjugação: LC3/Atg8 ou Atg12 (Pyo et al., 2012). No sistema

de conjugação Atg8, esta proteína é clivada pela Atg4 que retira uma arginina da região C-terminal de Atg8. A ligase Atg7 promove a ligação da Atg8 a Atg3, e posteriormente a glicina da porção C-terminal da Atg8 a fosfatidiletanolamina, fechando a PAS formando o autofagosomo. No segundo sistema de conjugação, a Atg12 é hidrolisada e novamente com a participação da Atg7, se liga a Atg10 que une a Atg12 à lisina de Atg5, a partir daí ocorre a organização do complexo Atg5-Atg12-Atg16, que também promove a formação do autofagosomo (revisto Klionsky & Emr, 2000 e em Kiel, 2010). Uma vez formado, o autofagosomo se funde aos lisosomos formando autofagolisosomo, onde hidrolases irão degradar componentes celulares englobados e a membrana interna do autofagosomo (revisto em Duszenko et al., 2011).

1.5.3. Autofagia em tripanosomatídeos

O envolvimento da macroautofagia vem sendo descrito em alguns protozoários na ausência de nutrientes ou mesmo após o tratamento com drogas (Uzcátegui et al., 2007; Barquilla et al., 2008; Corrêa et al., 2009; Giordani et al., 2011;), entretanto até o momento ainda não foram observadas microautofagia nem autofagia mediada por chaperonas em eucariotos inferiores.

Em tripanosomatídeos, foi demonstrada a presença de alguns genes ATG (revisto em Besteiro et al., 2007 e em Brennand et al., 2010). Em *T. brucei*, três isoformas de Atg8 foram detectadas sendo a Atg8.2 muito similar a LC3 presente em mamíferos (Li et al., 2012). Nesse tripanosomatídeo, a macroautofagia já foi observada através: (a) da inibição do complexo Tor 2 com rapamicina, bloqueando parcialmente a proliferação dos parasitos (Barquilla et al., 2008); (b) do tratamento do parasito com dihidroacetona que induziu o aparecimento de características morfológicas típicas desta via (Uzcátegui et al., 2007) e (c) do controle quantitativo e qualitativo de glicosomos, através da pexofagia (revisto em Kiel, 2010).

Em *Leishmania* sp., a metaciclogênese bem como a diferenciação de promastigotas para amastigotas têm o envolvimento da via autofágica (Besteiro et al., 2006, 2007). Em alguns gêneros de *Leishmania*, os lisosomos alteram

sua morfologia durante o desenvolvimento podendo indicar diferentes funções a depender do estágio do parasito, estando em forma túbulo multivesicular em promastigotas (Duskenzo et al., 2011). Em *L. major*, foi observada a presença dos dois sistemas de conjugação Atg8 e Atg12, dos genes ortólogos ATG3 e ATG7, além de duas isoformas de Atg4 (*LmAtg4.1* e *LmAtg4.2*). *LmAtg8* apresenta alta similaridade a Atg8 de fungos e LC3 de mamíferos, sendo esta proteína utilizada atualmente como marcador de autofagossomos em *Leishmania* sp. (revisto em Kiel et al., 2010).

Em *T. cruzi*, foram encontrados cerca de 20 genes homólogos de Atgs de levedura, dentre as quais destacam-se duas ATG4 (*TcAtg4.1* e *TcAtg8.2*), ATG7 e duas ATG8 (*TcAtg8.1* e *TcAtg8.2*) (revisto em Alvarez et al., 2008a; Brennand et al., 2010). Dessa forma, análises bioinformáticas ainda apontaram a existência do sistema de conjugação ATG8 completo nesse tripanosomatídeo, entretanto não foram detectados os principais componentes do sistema de conjugação ATG12 (ATG5, ATG10 e ATG12) (Ridgen et al., 2005; Herman et al., 2006; Alvarez et al., 2008b). Inúmeros estudos têm apontado a autofagia como parte do mecanismo de ação de diferentes classes de drogas, incluindo naftoquinonas, causando o aparecimento de estruturas membranares concêntricas no citosol, formação de vacúolos autofágicos e a superexpressão de Atgs (Menna-Barreto et al., 2007, 2009a,b,c). Assim como em *Leishmania* sp., foi observada a participação da via autofágica durante a metacicloênese de *T. cruzi*, sendo demonstrada uma intensa expressão de Atg8.1 em epimastigotas durante o processo de diferenciação, levando a hipótese da participação da autofagia como um mecanismo de sobrevivência do parasito na ampola retal do vetor, ambiente extremamente pobre em nutrientes (Alvarez et al., 2008a,2008b).

No contexto da busca de novos alvos racionais de drogas contra o parasito, iremos avaliar na presente dissertação: (a) o papel da autofagia no mecanismo de ação de naftoquinonas; (b) e a participação deste mecanismo no *T. cruzi* sob condições de estresse, como a redução da disponibilidade de nutrientes e as variações de pH, condições essas importantes durante a metacicloênese, bem como durante a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas nas células hospedeiras.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- ✓ Avaliar o efeito *in vitro* de naftoquinonas, do estresse de pH e nutricional sobre *Trypanosoma cruzi*;

Objetivos específicos

1. Analisar o efeito de naftoquinonas e derivados sobre as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, correlacionando a estrutura química com a atividade tripanocida;
2. Investigar o mecanismo de ação da naftoquinona **NT** sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia de fluorescência e eletrônica e citometria de fluxo;
3. Caracterizar o efeito do estresse de pH e nutricional em epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão, citometria de fluxo e eletroforese de DNA total.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Compostos

A partir de lapachol, extraído do lenho de árvores da família Bignoniaceae, foi sintetizado o nor-lapachol através da reação de Hooker (Pinto et al, 1980), matéria prima para a síntese da naftoquinona triazólica **NT** (2,2-dimetil-3-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2,3-dihidronafto[1,2-b]furano-4,5-diona), nosso objeto de estudo, realizada pelo Dr. Eufrânio N. Silva Júnior (Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais/UFRJ; Depto. de Química/UFMG). Brevemente, a reação de nor-lapachol com bromo em clorofórmio origina o bromo- β -nor-lapachol, que reagindo com azida de sódio gera a 3-azido-nor- β -lapachona, intermediário chave na síntese de naftoquinonas acopladas a um núcleo triazólico (Pinto et al, 1982). Esta azidoquinona através da reação com etinil-benzeno, catalizada por Cu(I), origina **NT** (**Figura 3.1**) (Silva Jr et al, 2008a).

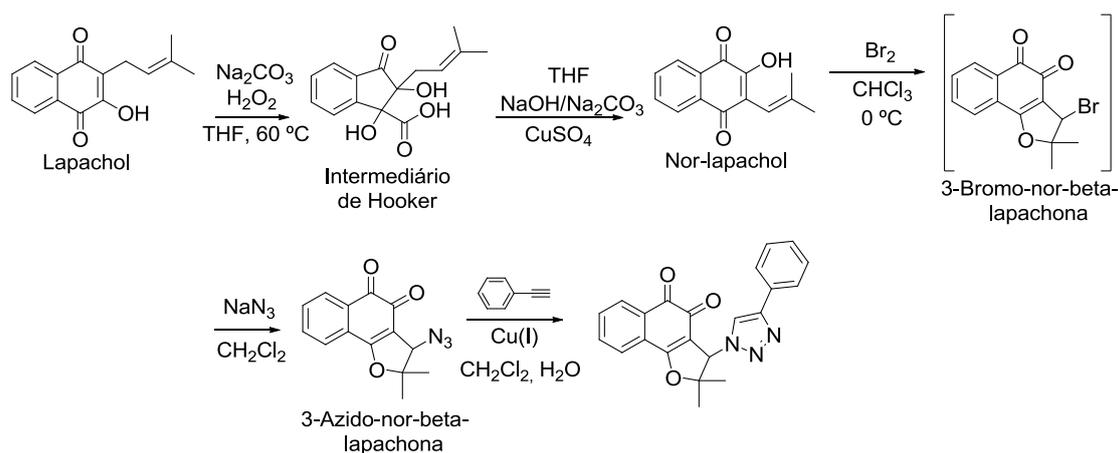


Figura 3.1. Rota de síntese de NT.

Os demais compostos estudados na presente dissertação pertencem à classe das hidroxinaftoquinonas, sintetizadas pela Dra. Maria Vargas (Instituto de Química/UFF) através da reação de 2-hidroxi-1,4 naftoquinona (lausona) com aminas primárias ou aldeídos em etanol. A síntese das hidroxinaftoquinonas **1A**, **1B**, **1C**, **2A**, **3A**, **7A**, **9A** já foi anteriormente publicada (Neves et al, 2009, 2010). Todos os demais compostos presentes na **Figura 3.2** e **Tabela 3.1** são moléculas novas cuja atividade biológica ainda é desconhecida.

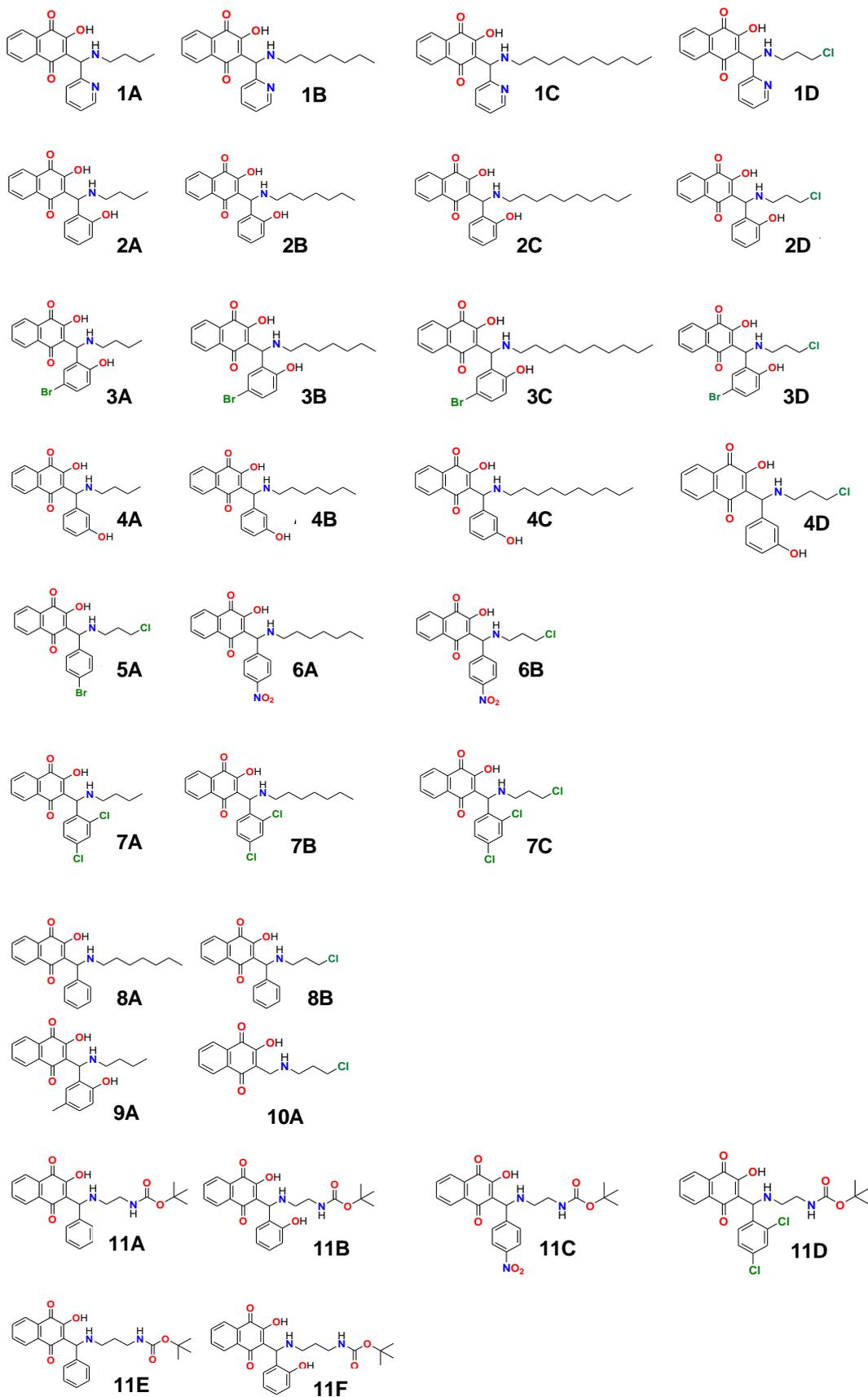


Figura 3.2. Estrutura química das hidroxinaftoquinonas.

Todas as soluções estoque dos compostos utilizados foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que a concentração de 4% não fosse excedida, pois esta dose não causa efeitos deletérios em tripomastigotas sanguíneos (De Castro et al, 1994).

Tabela 3.1. Hidroxinaftoquinonas estudadas

Cmp	Nomenclatura
1A	2-((butilamino)(piridina-2-il)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
1B	2-((heptilamino)(piridina-2-il)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
1C	2-((decilamino)(piridina-2-il)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
1D	2-((3-cloropropilamino)(piridina-2-il)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
2A	2-((butilamino)(2-hidroxifenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
2B	2-((heptilamino)(2-hidroxifenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
2C	2-((decilamino)(2-hidroxifenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
2D	2-((3-cloropropilamino)(2-hidroxifenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
3A	2-((5-bromo-2-hidroxifenil)(butilamino)metil)-3-hidroxinaftaleno- 1,4- diona
3B	2-((5-bromo-2-hidroxifenil)(heptilamino)metil)-3-hidroxinaftaleno- 1,4- diona
3C	2-((5-bromo-2-hidroxifenil)(decilamino)metil)-3-hidroxinaftaleno- 1,4- diona
3D	2-((5-bromo-2-hidroxifenil)(3-cloropropilamino)metil)-3-hidroxinaftaleno- 1,4- diona
4A	2-((butilamino)(3-hidroxifenil)-metil- 3- hidroxinaftaleno-1,4-diona
4B	2-((heptilamino)(3-hidroxifenil)-metil- 3- hidroxinaftaleno-1,4-diona
4C	2-((decilamino)(3-hidroxifenil)-metil- 3- hidroxinaftaleno-1,4-diona
4D	2-((3-cloropropilamino)(3-hidroxifenil)-metil- 3- hidroxinaftaleno-1,4-diona
5A	2-((4-bromofenil)(3-cloropropilamino)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
6A	2-((heptilamino)(4-nitrofenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
6B	2-((3-cloropropilamino)(4-nitrofenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
7A	2-((butilamino)(2,4-diclorofenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
7B	2-((2,4-diclorofenil)(heptilamino)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
7C	2-((3-cloropropilamino)(2,4-diclorofenil)-metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
8A	2-((heptilamino)(fenil)metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
8B	2-((3-cloropropilamino)(fenil)metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
9A	2-((butilamino)(2-hidroxil-5-metil-fenil)metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona
10A	2-((3-cloropropilamino)metil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona

11A	<i>Tert</i> -butil 2-((3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidro-naftalen-2-il)-(fenil)metil-amino)etilcarbamato
11B	<i>Tert</i> -butil 2-((3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidro-naftalen-2-il)-(2-hidroxifenil)-metilamino)etilcarbamato
11C	<i>Tert</i> -butil 2-((3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidro-naftalen-2-il)-(4-nitrofenil)-metilamino)etilcarbamato
11D	<i>Tert</i> -butil 2-((2,4-diclorofenil)-(3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidro naftalen-2-il)metilamino)etilcarbamato
11E	<i>Tert</i> -butil 3-((3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)(fenil)- metilamino)propilcarbamato
11F	<i>Tert</i> -butil 3-((3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)(2-hidroxifenil)-metilamino) propilcarbamato

3.2. Culturas primárias

Macrófagos foram cultivados de peritônio de camundongos Swiss Webster, aderidos em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (DMES) e mantidos a 37°C por 24 h. As células cardíacas foram obtidas através de cultura primária de coração de embriões de camundongos Swiss Webster (18 dias), sendo os corações submetidos a dissociações mecânica e enzimática utilizando 0,05% de tripsina e 0,01% de colagenase, como descrito previamente (Meirelles et al, 1986).

3.3. Parasitos

Em todos os experimentos foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenszweig, 1953). As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos Swiss infectados no pico da parasitemia, isoladas por centrifugação diferencial e resuspensas em DME (pH 7,4). Os epimastigotas foram mantidos em meio de infusão de fígado e triptose (LIT) (pH 7,4) suplementado com 10% SFB a 28°C e utilizados para os ensaios durante a fase exponencial de crescimento (5º dia).

3.4. Efeito direto sobre *T. cruzi*

Tripomastigotas sanguíneos foram ressuspensos na concentração de 10^7 células/mL em meio DMES. Essa suspensão (100 µL) foi adicionada, na ausência ou na presença de 5% de sangue murino, ao mesmo volume das naftoquinonas, previamente preparadas no dobro da concentração final

desejada e incubada a 4°C por 24 h. Alternativamente, ensaios foram realizados apenas em DMES (0% sangue). O efeito de **NT** na proliferação de epimastigotas em LIT foi monitorado a 28°C (24-96 h). A quantificação foi realizada em câmeras de Neubauer e a atividade dos compostos foi expressa em valores de IC₅₀, correspondendo à concentração que causa lise ou inibição da proliferação de 50% dos parasitos.

Para avaliação do efeito da variação de pH (pH 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10) bem como do estresse nutricional (0 e 20% SFB), foram realizadas curvas de proliferação de epimastigotas a 28°C utilizando como controle a condição pH7 10% SFB, sendo os parasitos quantificados nos tempos de 12, 24, 48, 72 e 96 h.

3.5. Efeito de NT na proliferação de amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss* foram cultivados em placas de 24 poços (2x10⁵ células/poço) em DMES e mantidos a 37°C. Após 24 h, a cultura foi lavada com DME e infectada com tripomastigotas sanguíneos (proporção de 10 parasitos/célula). Depois de 3 h de interação, as células foram lavadas em PBS para remover os parasitos não internalizados. Em seguida, foram incubadas com DMES na presença ou ausência de **NT** (24-96 h). Nos diferentes tempos, as células foram fixadas com Bouin por 5 min a 25°C, lavadas 3x com etanol 70% e coradas com Giemsa por 40 min a 25°C. As células foram quantificadas sendo utilizados os parâmetros percentagem de infecção e o número de parasitos/100 células.

3.6. Toxicidade de NT e das hidroxinaftoquinonas para células hospedeiras

A avaliação da toxicidade de **NT** sobre macrófagos não infectados foi realizada pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) como previamente descrito (Mosmann, 1983). As análises foram feitas a 490 nm no espectrofotômetro de placa Molecular Devices Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Alternativamente, a toxicidade das hidroxinaftoquinonas **1B**, **1C** e **2C** foi analisada sobre células musculares cardíacas através da redução da resazurina em resorufina (Azul de Alamar,

Invitrogen, Carlsbad, EUA). A absorvância detectada é proporcional ao número de células vivas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 e 600 nm, seguindo as recomendações do fabricante. O percentual de redução é calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{(117,216)(A_{\lambda_1})-(80,586)(A_{\lambda_2})}{(155,67)(C_{\lambda_2})-(14,652)(C_{\lambda_1})} \times 100$$

onde: **A**= célula tratada
C= célula não tratada (controle)
 $\lambda_1 = 570\text{nm}$; $\lambda_2 = 600\text{nm}$
 $(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_1 = 80,586$; $(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_2 = 117,256$
 $(\epsilon_{\text{red}})\lambda_1 = 155,67$; $(\epsilon_{\text{red}})\lambda_2 = 14,652$

3.7. Análise ultraestrutural

Epimastigotas (5×10^6 células/mL) foram tratados com 3-9 μM de **NT** por 24 h a 28°C. Após lavagem em PBS, os parasitos foram fixados em 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 40 min a 25°C. A pós-fixação foi realizada em solução de 1% tetróxido de ósmio contendo 0,8% ferricianeto de potássio e 2,5 mM de cloreto de cálcio por 20 min a 25°C, seguida pela etapa de desidratação em série crescente de acetona (50%, 70%, 90%, 100% e 100%). Para microscopia eletrônica de transmissão, o emblocamento foi realizado em resina PolyBed 812, sendo os cortes ultrafinos contrastados com 5% acetato de uranila (20 min) e citrato de chumbo (2 min) e analisados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM1011 (Tóquio, Japão). Para microscopia eletrônica de varredura, após as etapas de fixação e pós-fixação descritas acima, os parasitos foram aderidos em lamínulas recobertas com poli-L-lisina, desidratados em série crescente de acetona e posteriormente, secos em ponto crítico com CO_2 , metalizados com ouro (20 nm) e examinados no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV.

Para as análises dos possíveis danos ultraestruturais decorrentes do estresse de pH e nutricional, os epimastigotas (5×10^6 células/mL) foram mantidos nas diferentes condições a 28°C por 24 e 96 h. Após esses períodos,

os parasitos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão conforme descrito anteriormente.

3.8. Análise por microscopia de fluorescência

Após o tratamento com **NT** por 24 h, os epimastigotas (3×10^6 células/mL) foram lavados com PBS e incubados em $100 \mu\text{M}$ monodansilcadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 60 min a 28°C para avaliação da presença de vacúolos autofágicos (Munafó e Colombo, 2001). Após a marcação, os parasitos foram lavados em PBS e fixados em 4% PFA por 40 min a 25°C , e a quantificação do percentual de epimastigotas MDC+ foi realizada no microscópio Zeiss AxioObserver M1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

A avaliação da presença de vacúolos autofágicos em parasitos mantidos em diferentes condições de estresse (pH e nutricional) por 24 e 96 h também foi realizado seguido o protocolo descrito acima.

3.9. Análise por citometria de fluxo

Os epimastigotas (5×10^6 células/mL) foram tratados com diferentes concentrações de **NT** ($1,5 - 9 \mu\text{M}$) por 24 h a 28°C e incubados com diferentes marcadores fluorescentes. Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), os parasitos foram incubados por 30 min a 28°C com 50 nM ester de tetrametil rodamina (TMRE) (Molecular Probes, Carlsbad, EUA). A incubação com $10 \mu\text{M}$ do dissipador de $\Delta\Psi\text{m}$, cianeto de carbonila 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP) (Sigma-Aldrich), foi empregada como controle negativo.

Para análise do efeito de **NT** no ciclo celular do *T. cruzi*, epimastigotas foram permeabilizados em solução contendo 0,1% saponina, 5% SFB e 1% albumina sérica bovina (BSA) seguida pela incubação com $30 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio (IP) por 30 min a 28°C .

As sondas fluorescentes dihidroetídio (DHE) e Mitosox Red (Molecular Probes) foram utilizadas para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após o tratamento com **NT**. Epimastigotas foram marcados com $10 \mu\text{M}$ DHE ou $5 \mu\text{M}$ Mitosox Red por 30 min a 28°C visando a detecção,

respectivamente, dos níveis de EROs total e mitocondrial. Parasitos tratados com 22 μ M antimicina (AA) (Sigma-Aldrich) - inibidor irreversível do complexo III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial - foram considerados o controle positivo da marcação.

O efeito do estresse de pH, testado em pH 3 e 10 e do estresse nutricional (pH 7) com 0 ou 20% SFB foi avaliado em 24 e 96 h, utilizando como parâmetros de dano mitocondrial a perda do $\Delta\Psi_m$ (incubação com TMRE) e a produção de EROs (marcação com DHE), seguindo a metodologia semelhante a descrita para o tratamento com **NT**. Além disso, foi analisada a integridade da membrana plasmática de epimastigotas sob estresse através da incubação dos parasitos vivos com 30 μ g/mL IP por 30 min a 28°C, utilizando 0,1% saponina como controle positivo de permeabilização.

Após as marcações com as diferentes sondas fluorescentes, os dados foram adquiridos e analisados utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, CA, EUA) equipado com software CellQuest (Joseph Trotter, Instituto de Pesquisa Scripps, CA, EUA). Para cada marcação, um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida que corresponde aos parasitos. Os dados obtidos nos ensaios com todas as sondas foram expressos através da percentagem de parasitos marcados. As variações na fluorescência de TMRE foram também quantificadas usando o índice de variação (IV) obtido pela equação $(MT-MC)/MC$, onde MT equivale a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC equivale a mediana da fluorescência dos parasitos controle (Menna-Barreto et al, 2005).

3.10. Análise por eletroforese em gel de agarose

Epimastigotas (5×10^6 células/mL) incubados nas diferentes condições de estresse (0% SFB, 20% SFB, pH 3 e 10) por 24 e 96 h foram lavados em PBS e o DNA total foi extraído na presença de RNase A usando o kit DNA Wizard (Promega, Madison, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de 1,5% agarose em voltagem constante de 90 V. Os géis foram revelados com GelRedTM (Biotium, Hayward, EUA) seguindo as instruções do fabricante, e os resultados visualizados e documentados no sistema foto-documentação gel-UVP Bioimaging (Upland, CA, EUA).

3.11. Análise estatística

Todas as análises realizadas utilizaram o teste não paramétrico Mann-Whitney para comparar os grupos controle e experimentais. Diferenças com $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de naftoquinonas sobre *T. cruzi*

Dentre as naftoquinonas derivadas de lausona testadas sobre tripomastigotas sanguíneos, os compostos **1B**, **1C** e **2C** foram os mais ativos, com $IC_{50}/24\text{ h} = 104,6 \pm 22,6\ \mu\text{M}$, $77,3 \pm 6,8\ \mu\text{M}$ e $211,7 \pm 32,3\ \mu\text{M}$, respectivamente (**Tabela 4.1**). O derivado **1C** apresentou excelente atividade tripanocida, sendo mais ativo que o **Bz** ($IC_{50}/24\text{ h} = 103,6 \pm 0,6\ \mu\text{M}$), composto padrão utilizado no tratamento clínico da doença de Chagas.

Tabela 4.1. Atividade dos compostos sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Compostos	$IC_{50}/24\text{h}\ (\mu\text{M})^a$
1A	>4000
1B	104,6 ($\pm 22,61$)
1C	77,3 ($\pm 6,82$)
1D	>1900
2A	>1200
2B	>4000
2C	211,7 ($\pm 32,3$)
2D	>1200
3A	2147 ($\pm 483,7$)
3B	3516,5 ($\pm 146,4$)
3C	>2500
3D	686 ($\pm 75,72$)
4A	>1200
4B	>1400
4C	>1700
4D	>2500
5A	>4000
6A	>4000
6B	>4000
7A	>4000
7B	>4000
7C	>4000
8A	562,11 ($\pm 55,02$)
8B	>4000
9A	>1200
10A	1538,56 ($\pm 153,45$)
11A	>4000
11B	764,4 ($\pm 82,0$)
11C	>4000
11D	>2000
11E	>2000
11F	868,8 ($\pm 88,19$)
Bz	103,6 \pm 0,6 ^b

^a Média \pm desvio padrão de, no mínimo, três experimentos independentes. ^b Silva Jr et al, 2008a.

A citotoxicidade de **1B**, **1C** e **2C** foi avaliada por ensaio de resazurina (azul de Alamar). Os três compostos apresentaram efeito tóxico para células musculares cardíacas após 48 h de tratamento em concentrações semelhantes ou superiores aos respectivos valores de IC₅₀.

Estudos prévios demonstraram que dentre a série de naftofuranoquinonas 1,2,3-triazólicas derivadas de nor-lapachol testadas, o composto **NT** foi o que apresentou maior atividade justificando estudos mais aprofundados de seu mecanismo de ação. Este composto foi ativo sobre as três formas do *T. cruzi* com o IC₅₀/24 h variando de 5 a 25 µM (**Tabela 4.2**). Sobre tripomastigotas sanguíneos, o efeito de **NT** foi avaliado na ausência ou na presença de 5% de sangue, sendo os valores de IC₅₀/24 h 23,3 ± 2,8 µM e 17,3 ± 2,0 µM, respectivamente. As formas proliferativas epimastigotas e amastigotas foram bastante sensíveis a **NT** sendo o efeito inibitório dose-dependente (**Tabela 4.2, Figuras 4.1a,b**), reduzindo em 81% o número de células infectadas depois de 4 dias de tratamento (**Figura 4.1b**). A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT apontando que a concentração de 10 µM levou à morte de 60% dos macrófagos tratados com **NT**, dose essa que representa o dobro das utilizadas nos ensaios com células infectadas.

Tabela 4.2. Valores de IC₅₀ (µM) de **NT** nas diferentes formas de *T. cruzi*

ht ^a	Tripomastigotas		Epimastigotas	Amastigotas
	0% sangue	5% sangue		
24	23,3 ± 2,8 ^b	17,3 ± 2,0 ^c	7,6 ± 0,6	5,2 ± 1,1 ^d
48	-	-	5,3 ± 1,5	2,3 ± 0,4
72	-	-	5,4 ± 1,6	1,4 ± 0,3
96	-	-	4,7 ± 2,4	2,9 ± 0,8

^a Horas de tratamento. ^b Média de três experimentos independentes. ^c Silva Jr et al. 2008a.

^d Número de parasitos/ 100 macrófagos.

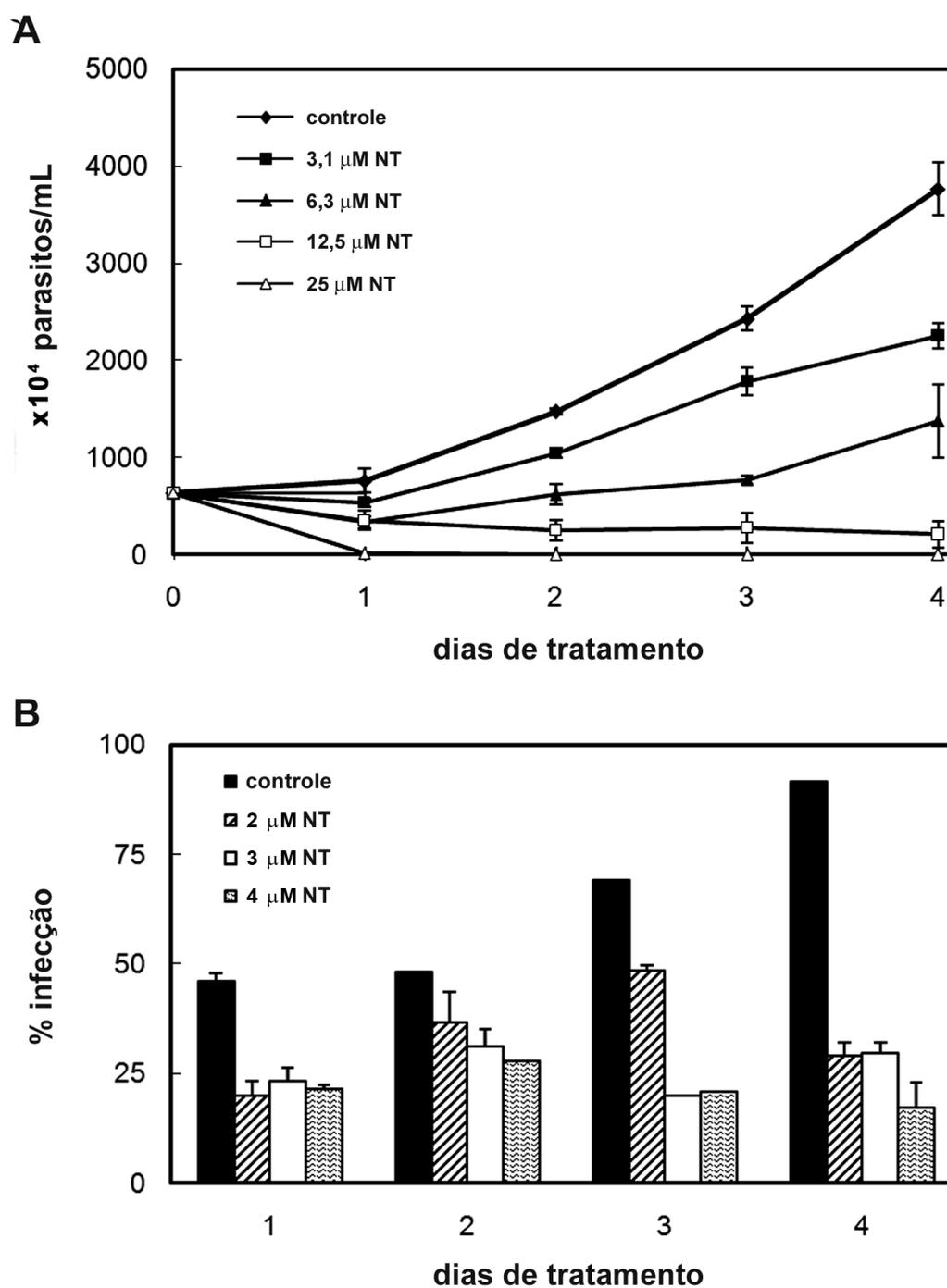


Figura 4.1. Efeito de NT na proliferação de *T. cruzi*. (a) Epimastigotas; (b) Amastigotas intracelulares. Os gráficos mostram os valores de média e desvio padrão de um experimento representativo.

Visando caracterizar o mecanismo de ação de **NT**, foram realizadas análises por microscopia eletrônica e citometria de fluxo de epimastigotas tratados com concentrações abaixo do valor de IC_{50} . Por microscopia eletrônica de transmissão, parasitos controle foram observados com morfologia normal da mitocôndria, núcleo, cinetoplasto e reservossomos (**Figura 4.2**). O tratamento de epimastigotas com 3 e 6 μ M **NT** (**Figuras 4.3 e 4.4**) induziu o surgimento de perfis de retículo endoplasmático bem desenvolvidos envolvendo diversas estruturas subcelulares, especialmente reservossomos e uma intensa desorganização da morfologia dessa organela, incluindo ruptura da sua membrana. “*Blebbing*” da membrana flagelar, desorganização das cisternas do Golgi e a presença de estruturas membranares concêntricas no citosol foram as outras alterações observadas. Não foram detectadas alterações ultraestruturais na mitocôndria do parasito.



Figura 4.2. Micrografia eletrônica de transmissão de epimastigota de *T. cruzi* controle apresentando morfologia típica de mitocôndria (M), núcleo (N), cinetoplasto (C) e reservossomos (R). Barra = 1 μ m.

A análise por microscopia de fluorescência revelou um aumento no percentual de epimastigotas marcados com MDC de até 30% após o tratamento com diferentes doses do composto (**Figura 4.5**). Através da técnica de citometria de fluxo, avaliamos o $\Delta\Psi_m$ através da marcação com TMRE. Não foram detectadas alterações na intensidade de fluorescência de parasitos tratados com 1,5 a 6 μM NT, entretanto 9 μM NT levou a uma redução de 28% do $\Delta\Psi_m$, em relação ao controle (**Tabela 4.3**).

Em um segundo grupo de experimentos, epimastigotas tratados foram permeabilizados com saponina e marcados com IP para avaliação do ciclo celular. O tratamento com a naftoquinona levou a uma diminuição significativa do percentual de parasitos com DNA duplicado, inibindo entre 27-52% (**Figura 4.6**). A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que parasitos tratados com 3 e 6 μM NT apresentaram vários flagelos e morfologia do corpo celular anormal durante a divisão celular (**Figura 4.7**).

A produção de EROs também foi analisada através da marcação com DHE e Mitosox Red (**Figura 4.8**). O tratamento com NT (3 a 9 μM) induziu um aumento no percentual de epimastigotas DHE+ (**Figura 4.8a**), sendo significativo na concentração de 9 μM . Esse aumento não foi observado em parasitos marcados com Mitosox Red (**Figura 4.8b**).

Tabela 4.3. Análise do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com NT por citometria de fluxo

	% parasitos TMRE +	Mediana	IV ^a
controle	98,1 ± 0,5	22,5 ± 3,4	0,00
controle + 10 μM FCCP	2,2 ± 2,6	3,4 ± 1,2*	-0,85
1,5 μM NT	98,8 ± 0,3	25,7 ± 5,6	0,14
3,0 μM NT	98,5 ± 0,8	23,6 ± 1,8	0,07
6,0 μM NT	97,6 ± 1,6	21,6 ± 1,1	-0,03
9,0 μM NT	96,4 ± 1,8	16,3 ± 3,3*	-0,28

^a IV = (MT – MC)/MC, onde MT corresponde ao valor da mediana de fluorescência de parasitos tratados e MC corresponde a mediana de parasitos controle. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$).

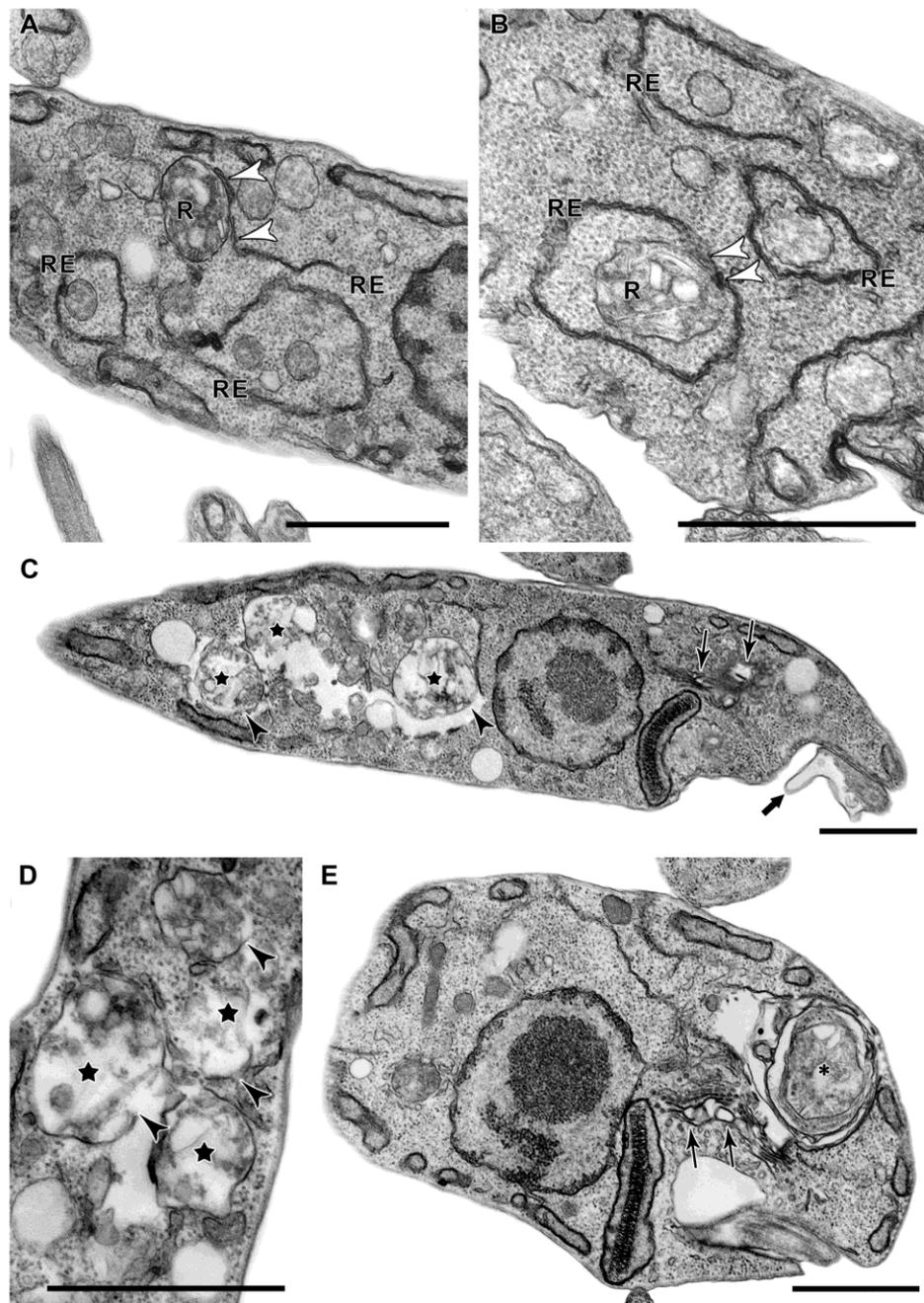


Figura 4.3. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados com 3 μM NT. (A,B) Os parasitos apresentam perfis de retículo endoplasmático bem desenvolvido (ER) envolvendo reservosomos (R) (setas brancas). (C-E) O tratamento levou a intensa desorganização da morfologia dos reservosomos (estrelas pretas) (C-D) com perda da integridade das suas membranas (cabeça de setas pretas) (C-D), formação de *blebs* na membrana flagelar (setas pretas grossas) (C), rompimento do Golgi (setas pretas) (C), além do aparecimento de estruturas membranares concêntricas no citosol (asterisco) (E). Barras = 1 μm .

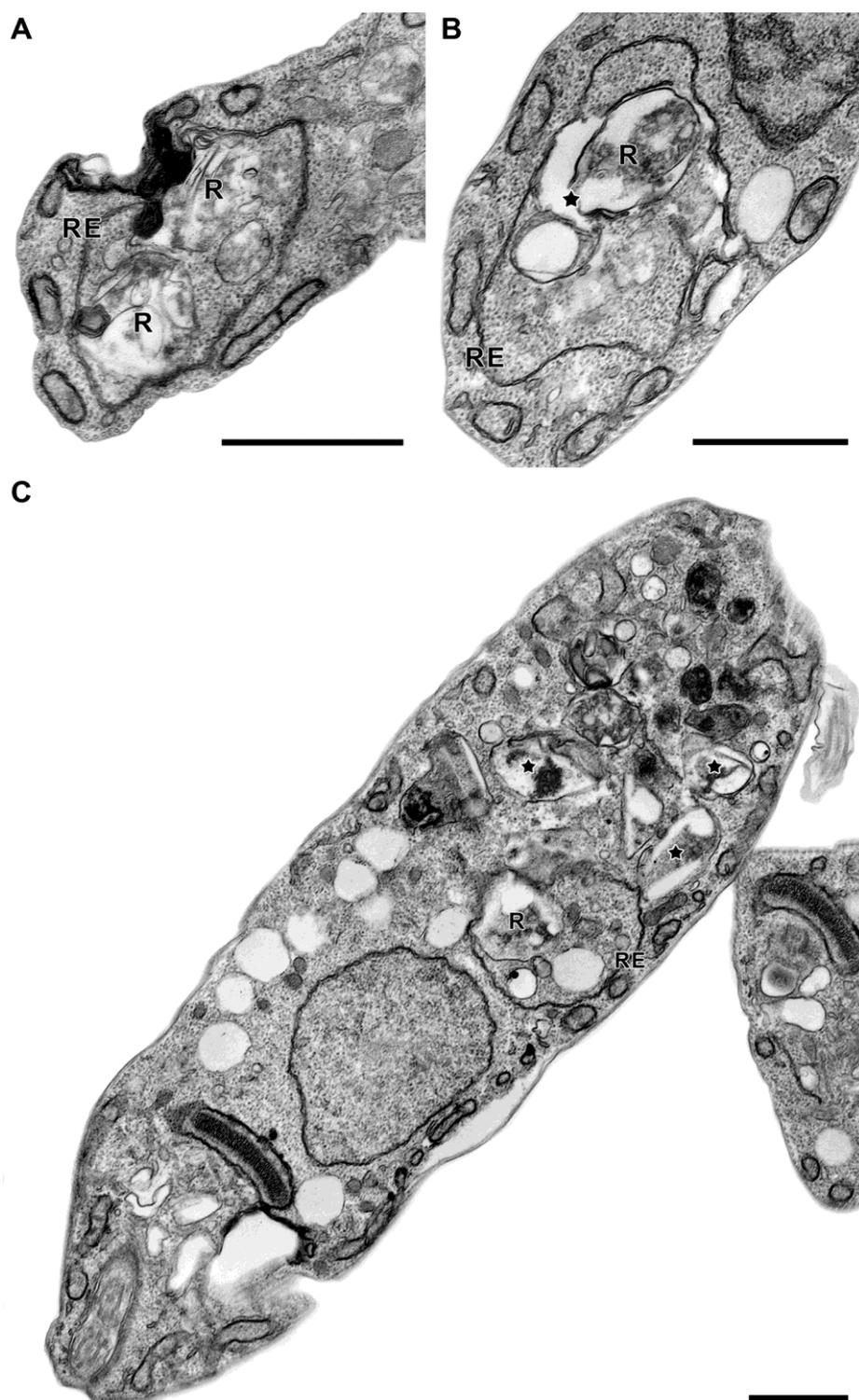


Figura 4.4. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados com 6 μ M NT. (A-C) NT induziu o surgimento de perfis de retículo endoplasmático (ER) envolvendo reservosomos (R) (A-B), assim como o rompimento dessa organela (estrela preta) (B-C). Barras = 1 μ m.

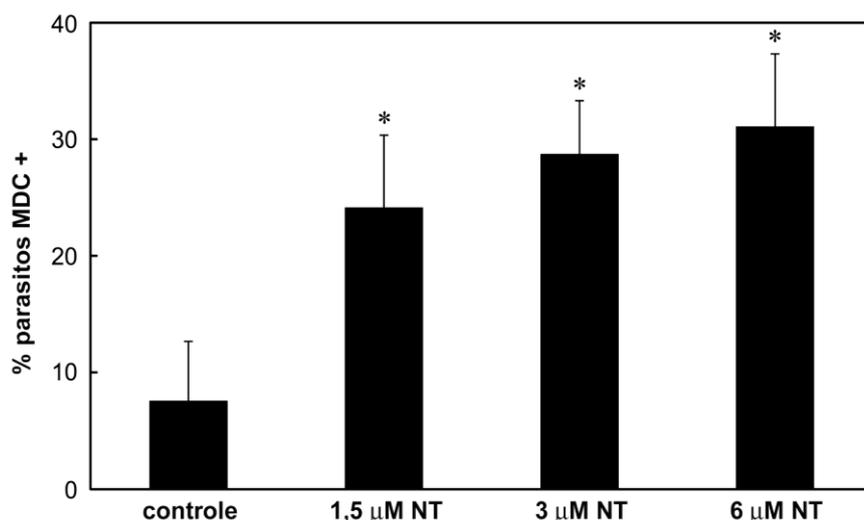


Figura 4.5. Análise por microscopia de fluorescência da marcação com MDC de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com NT. O tratamento induz um aumento no número de parasitos contendo vacúolos autofágicos. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,009$).

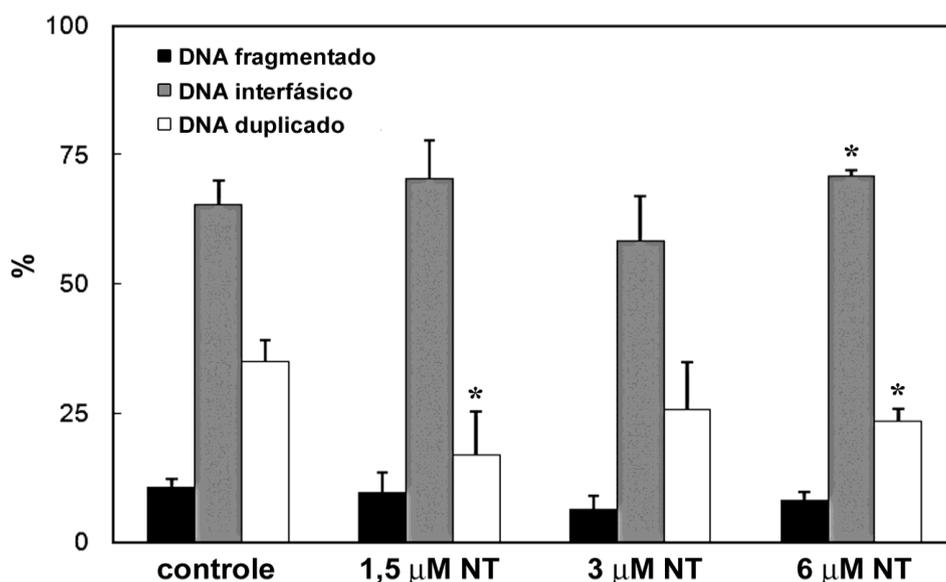


Figura 4.6. Análise do ciclo celular de epimastigotas tratados com NT por citometria de fluxo. O tratamento com a naftoquinona levou a uma diminuição na percentagem de epimastigotas com DNA duplicado. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).

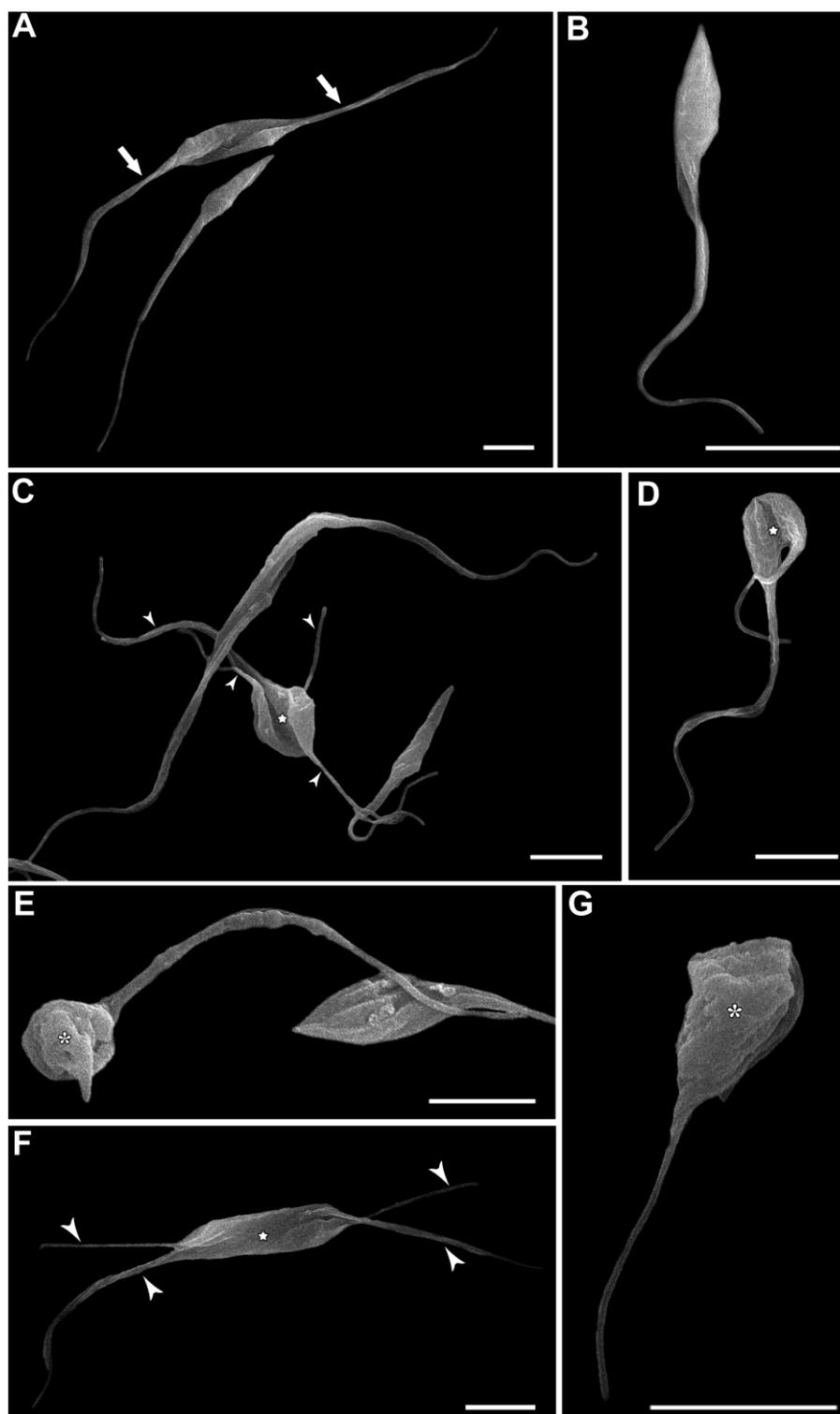


Figura 4.7. Análise por microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas tratados com NT. (A,B) Parasitos controle com morfologia típica do corpo durante a mitose (setas grossas). O tratamento com (C-E) 3 μ M e (F,G) 6 μ M NT levou ao aparecimento multiflagelos (cabeça de setas), além da morfologia anormal durante a citocinese (estrela) e alteração no formato do corpo (asteriscos). Barras = 5 μ m.

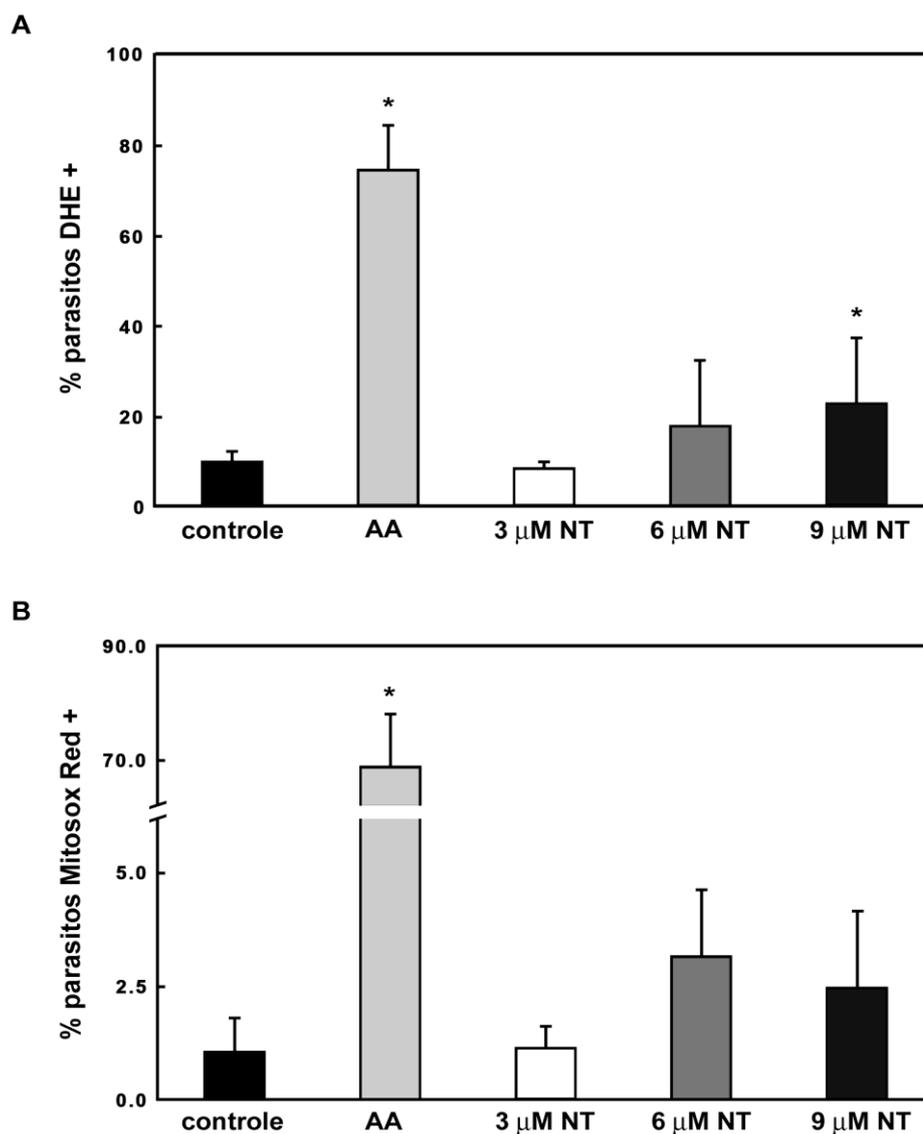


Figura 4.8. Avaliação da produção de ROS em epimastigotas de *T. cruzi* tratados com **NT** por citometria de fluxo. A marcação com (a) DHE e (b) Mitosox Red. O tratamento com **NT** levou a um aumento no percentual de parasitos produzindo ROS. A incubação com antimicina A (AA) foi utilizada como controle positivo. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).

4.2. Efeito do estresse de variação do pH e nutricional sobre formas epimastigotas

Para avaliar o efeito do estresse de variação do pH sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, os parasitos foram incubados em meio LIT contendo 10% SFB com diferentes faixas de pH ácidos (pH 3, pH 5 e pH 6) e básicos (pH 8, pH 9 e pH 10). Já para análise do estresse nutricional, epimastigotas foram mantidos em LIT pH 7, contendo diferentes concentrações de SFB (0%, 5% e 20%). Tanto para estresse de pH quanto nutricional, epimastigotas em LIT pH 7 + 10% SFB foram utilizados como controle. Inicialmente, um possível efeito de tamponamento do meio de cultura pelos epimastigotas foi avaliado por até 96 h. Após esse período, os meios LIT ácidos mantiveram pH abaixo de 7, entretanto se aproximaram mais do pH fisiológico. Da mesma forma, os meios básicos sofreram fenômeno semelhante, também aproximando-se do pH neutro. Nas condições utilizadas para estresse nutricional não houve variação de pH (Figura 4.9).

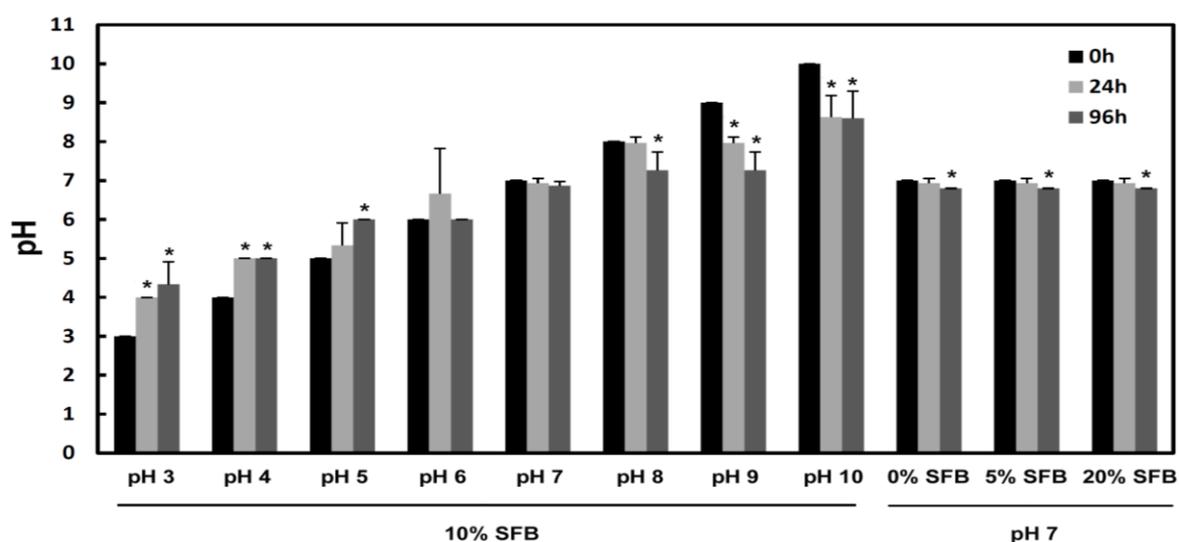


Figura 4.9. Cinética de alcalinização e acidificação do meio LIT por epimastigotas de *T. cruzi*. Asteriscos representam diferença significativa de cada condição em relação ao tempo 0h ($p \leq 0,05$).

A cinética de proliferação de epimastigotas sob condições de estresse apontou uma diminuição significativa do percentual de parasitos viáveis a partir de 24 h nas condições extremas ácidas (pH 3) e básicas (pH 10) (**Figura 4.10A-E**). Em 96 h, todas as variações de pH ácido testadas apresentaram diferença estatística em relação aos epimastigotas controle em pH neutro (**Figura 4.10E**). As condições de estresse nutricional testadas (0% e 5% SFB) apresentaram uma redução da proliferação de epimastigotas em 6, 24 e 96 h, enquanto o aumento da disponibilidade de SFB acarretou um consequente aumento do número de parasitos em 96 h, aumento este que foi estatisticamente significativo (**Figura 4.10F**). Com base nos dados obtidos, foram selecionadas as condições ácidas (pH 3), básicas (pH 10) e o estresse nutricional decorrente da ausência (0% SFB) ou excesso (20% SFB) de soro nos tempos de 24 e 96 h para os experimentos subsequentes.

Análises por citometria de fluxo de epimastigotas nas condições de estresse selecionadas foram realizadas visando avaliar: (a) morfologia dos parasitos; (b) $\Delta\Psi_m$ (marcação com TMRE); (c) produção de EROs (marcação com DHE); e (d) integridade da membrana plasmática (marcação com IP em parasitos não permeabilizados). A avaliação morfológica dos epimastigotas nas diferentes condições de estresse não apontou diferenças no tamanho dos parasitos até 96 h (**Figura 4.11**). Entretanto, a condição ácida (pH3) levou ao aparecimento de uma subpopulação parasitária de maior granulosidade em todos os tempos testados (**Figura 4.11A,B**).

Em relação à funcionalidade mitocondrial, o $\Delta\Psi_m$ foi avaliado utilizando o FCCP (ionóforo e potente dissipador do potencial mitocondrial) como controle. Os parasitos submetidos ao estresse ácido ou básico por 24 h apresentaram uma diminuição da marcação de TMRE de 75 e 53%, respectivamente. Em 96 h, o efeito da alcalinização e acidificação do meio LIT se manteve, levando a uma redução de 76 e 65% na intensidade de fluorescência, respectivamente (**Tabela 4.4**). Interessantemente, as duas condições de estresse nutricional testadas não levaram a alterações significativas na marcação de TMRE tanto em 24 h como 96 h.

Tabela 4.4. Análise do $\Delta\Psi_m$ em epimastigotas de *T. cruzi* submetidos a estresse de pH e nutricional

	IV 24h	IV 96h
pH7 + 10%SFB	0,00	0,00
pH7 + 10%SFB + 10 μ M FCCP	-0,73 ^{a,*}	-0,70*
pH7 + 0%SFB	0,25	0,48
pH7 + 20%SFB	-0,28	-0,38
pH3 + 10%SFB	-0,75*	-0,76*
pH10 + 10%SFB	-0,53*	-0,65*

^a Médias de pelo menos 4 experimentos independentes.

* Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle pH7 + 10%SFB ($p < 0,007$).

A produção de EROs também foi analisada, sendo empregado como controle a incubação com AA (inibidor do complexo III mitocondrial e potente indutor da geração de espécies reativas). As condições ácidas (pH3) e básicas (pH10) induziram um aumento significativo do percentual de parasitos DHE+ em torno de 75 e 25%, respectivamente. A condição hiponutricional também levou a um discreto aumento de epimastigotas marcados apenas em 96 h (**Figura 4.12**).

Epimastigotas sob as diferentes condições de estresse foram incubados com IP (intercalante de DNA de alto peso molecular) para avaliação da integridade da membrana plasmática de 6 a 96 h. Em nenhum dos tempos analisados, o percentual de parasitos com perda da integridade da membrana excedeu 4% (**Figura 4.13A**). A fragmentação de DNA (evento chave durante os processos de morte celular) também foi avaliada, não sendo observadas bandas de pesos abaixo de 1,5 kpb, demonstrando a ausência de fragmentação em todas as condições testadas em 24 e 96h (**Figura 4.13B**).

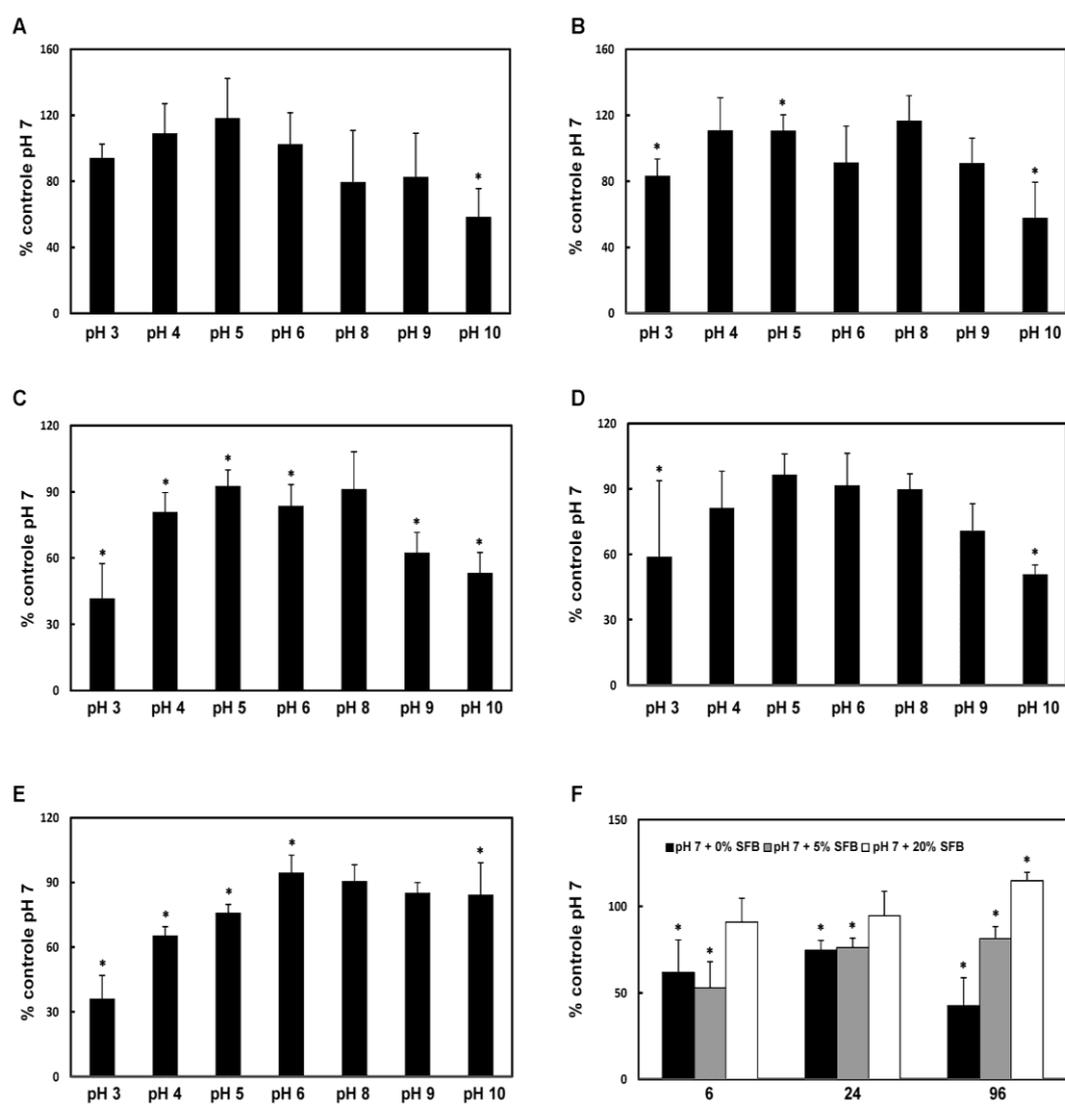


Figura 4.10. Viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* submetidos a diferentes condições de estresse de pH (A-E) e nutricional (F). (A) 6 h, (B) 24 h, (C) 48 h, (D) 72 h e (E) 96 h. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle pH 7 + 10% SFB ($p \leq 0,05$).

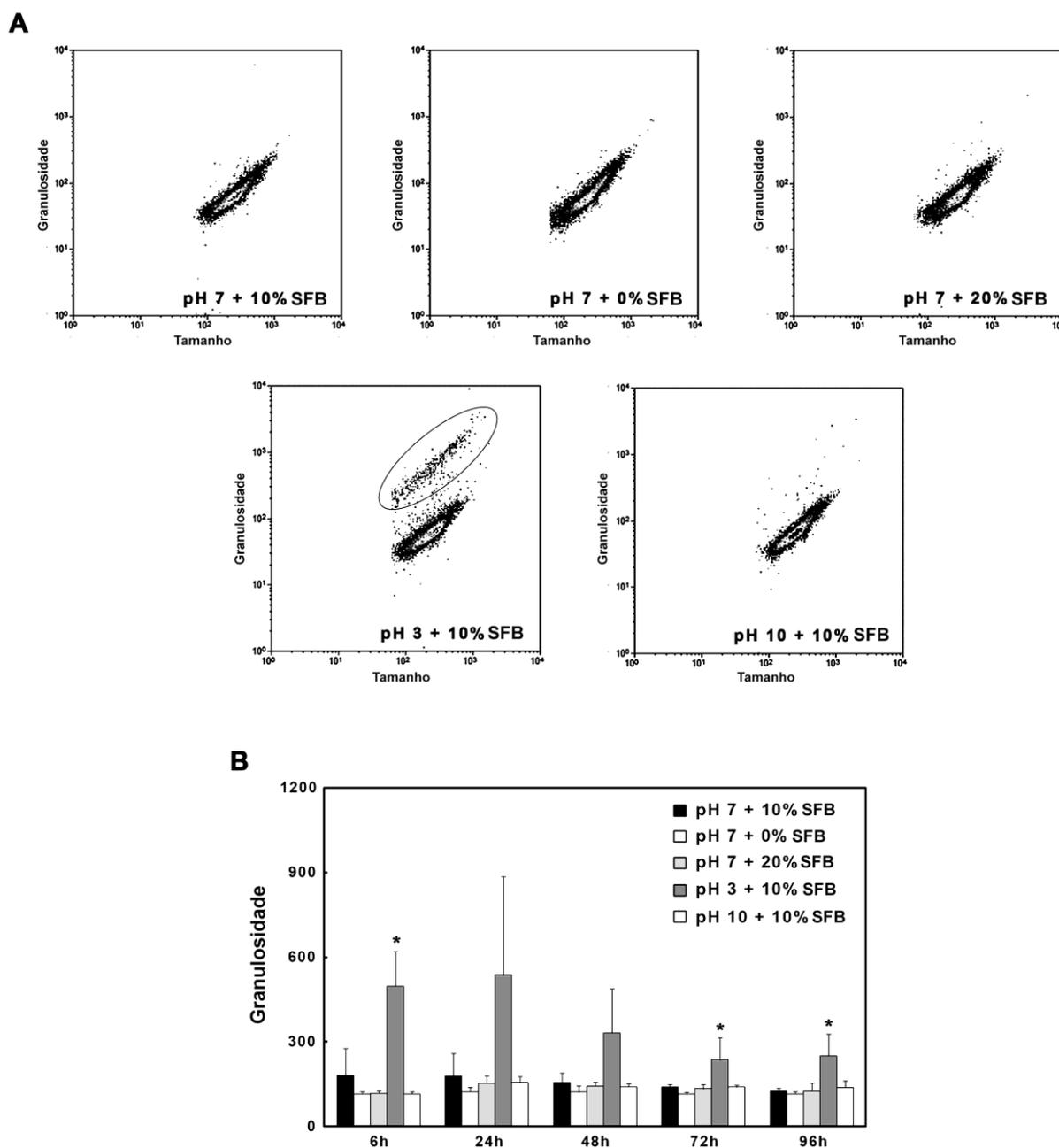


Figura 4.11. Efeito do estresse de pH e nutricional no tamanho e granulosidade em epimastigotas de *T. cruzi*. **(A)** Gráficos de *dot plot* representativos do tempo de 96 h, onde a região no círculo em destaque corresponde a uma subpopulação de epimastigotas com maior granulosidade. **(B)** Cinética do efeito das condições de estresse na granulosidade. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle pH 7 + 10% SFB ($p \leq 0,05$).

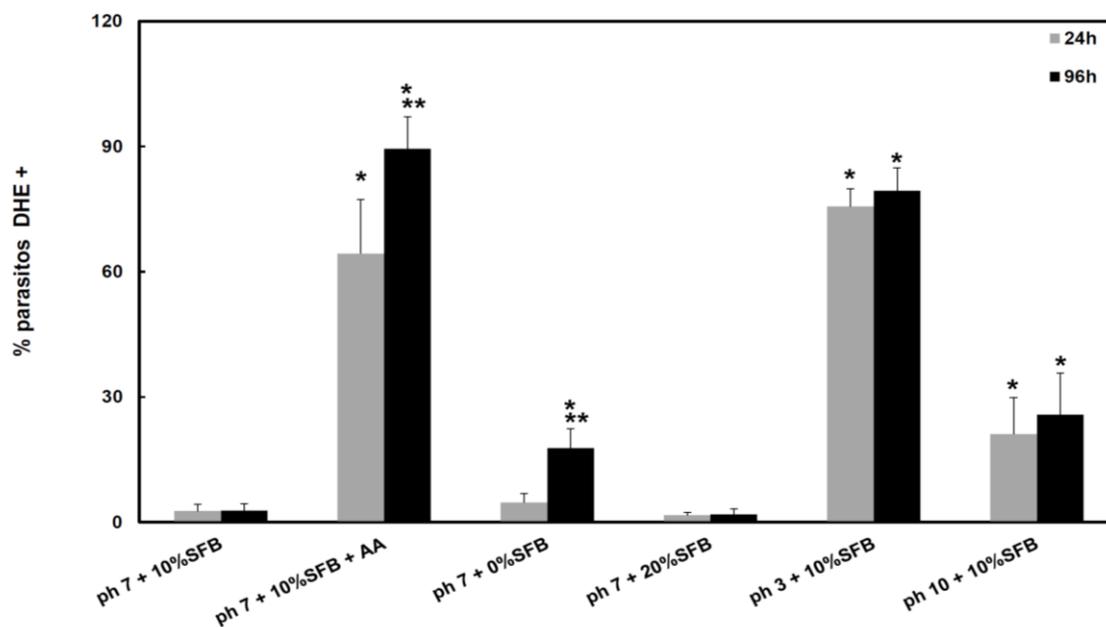


Figura 4.12. Avaliação da produção de EROs em parasitos submetidos a estresse de pH e nutricional. Um asterisco representa diferença significativa em relação ao controle pH7 + 10%SFB ($p \leq 0,006$); Dois asteriscos representam diferenças da mesma condição nos tempos de 24 e 96h ($p < 0,03$).

A análise da participação da via autofágica nas diferentes condições de estresse foi realizada por microscopia de fluorescência utilizando o marcador de vacúolos autofágicos MDC. Um aumento no percentual de epimastigotas marcados com MDC de até 20% foi observado nas condições de escassez nutricional ou pH (ácido e básico) em relação ao controle. A suplementação do meio de cultura com 20% SFB não induziu autofagia em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 4.14**).

O efeito ultraestrutural dos estresses de pH e nutricional em epimastigotas foi analisado em 96 h por microscopia eletrônica de transmissão. No controle bem como na condição 20%SFB, os parasitos mantiveram aspecto característico de organelas como a mitocôndria tipicamente alongada ao redor do corpo celular, núcleo, Golgi, cinetoplasto, flagelo e reservosomos (**Figura 4.15 A, B**).

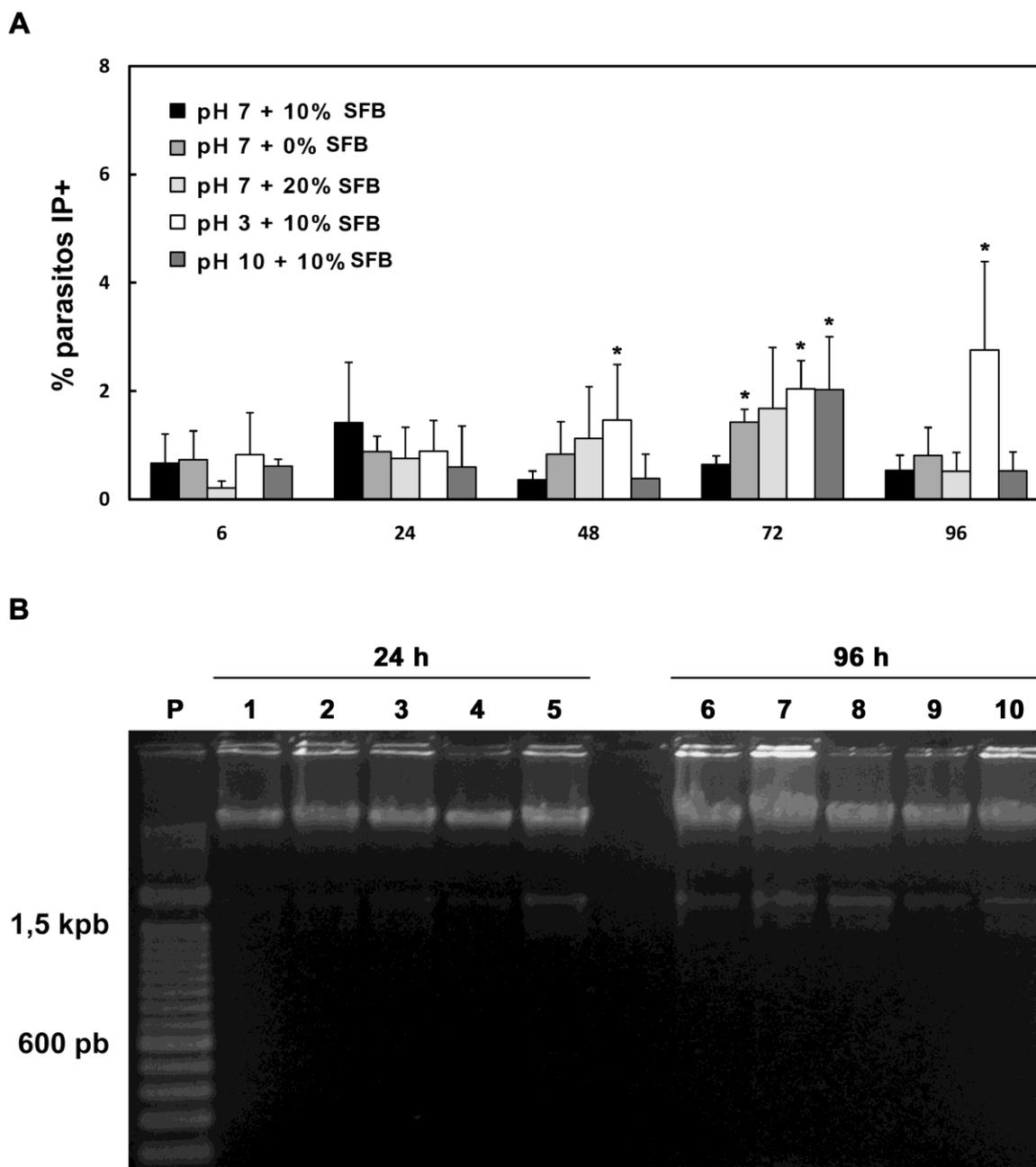


Figura 4.13. Análise da integridade da membrana plasmática e da fragmentação de DNA em epimastigotas de *T. cruzi* submetidos ao estresse de pH e nutricional. **(A)** Cinética de marcação com IP em parasitos não permeabilizados. Asteriscos representam diferenças significativas em relação ao controle pH 7 + 10% SFB ($p \leq 0,05$). **(B)** Avaliação da fragmentação do DNA total por eletroforese em gel de agarose. P: padrão de peso molecular; colunas 1 e 6: pH 7 + 10% SFB; colunas 2 e 7: pH 7 + 0% SFB; colunas 3 e 8: pH 7 + 20% SFB; colunas 4 e 9: pH 3 + 10% SFB; colunas 5 e 10: pH 10 + 10% SFB.

Epimastigotas incubados na ausência de SFB por 96 h apresentaram principalmente o aparecimento de estruturas membranares concêntricas no interior da mitocôndria e no citosol (**Figura 4.16**). As mitocôndrias perderam seu arranjo alongado típico e os reservosomos, sua elétrion-densidade característica (**Figura 4.17**). Diferentes estágios de invaginação da membrana dos reservosomos puderam ser observados, além de estruturas membranares concêntricas no interior da organela (**Figura 4.17**). Não foram detectadas alterações morfológicas no flagelo, núcleo, cinetoplasto, nos microtúbulos subpeliculares ou na membrana plasmática.

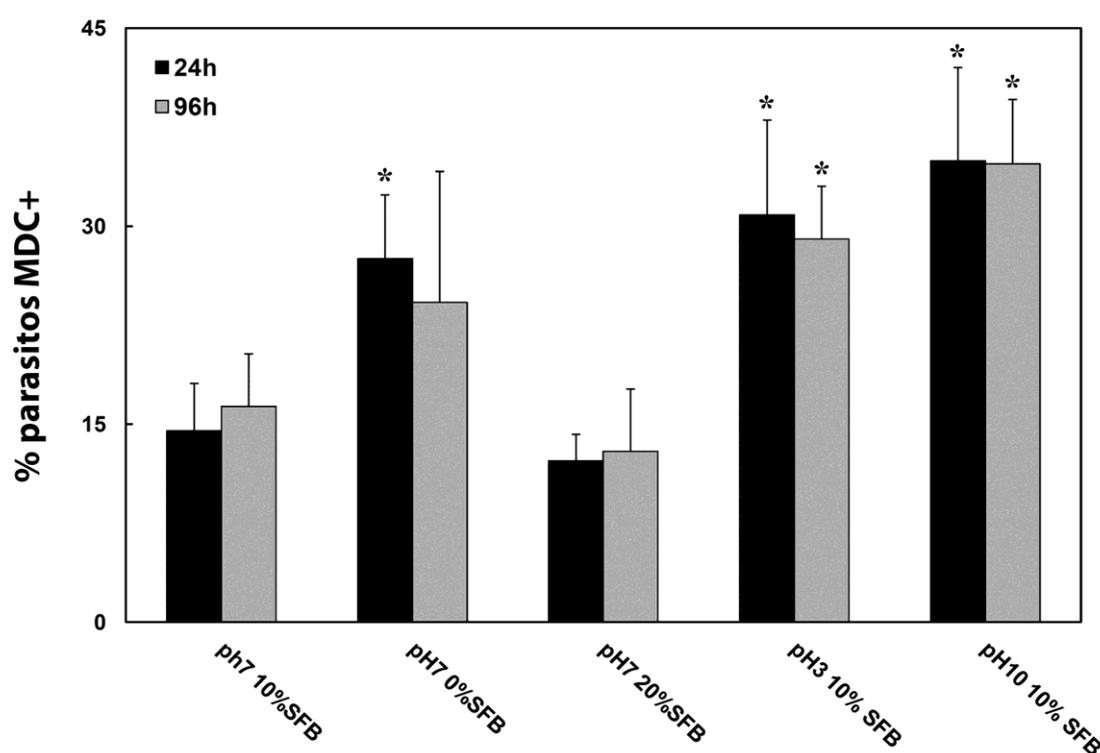


Figura 4.14. Análise por microscopia de fluorescência da marcação com MDC de epimastigotas de *T. cruzi* submetidos às condições de estresse. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle pH 7 + 10% SFB ($p \leq 0,025$).

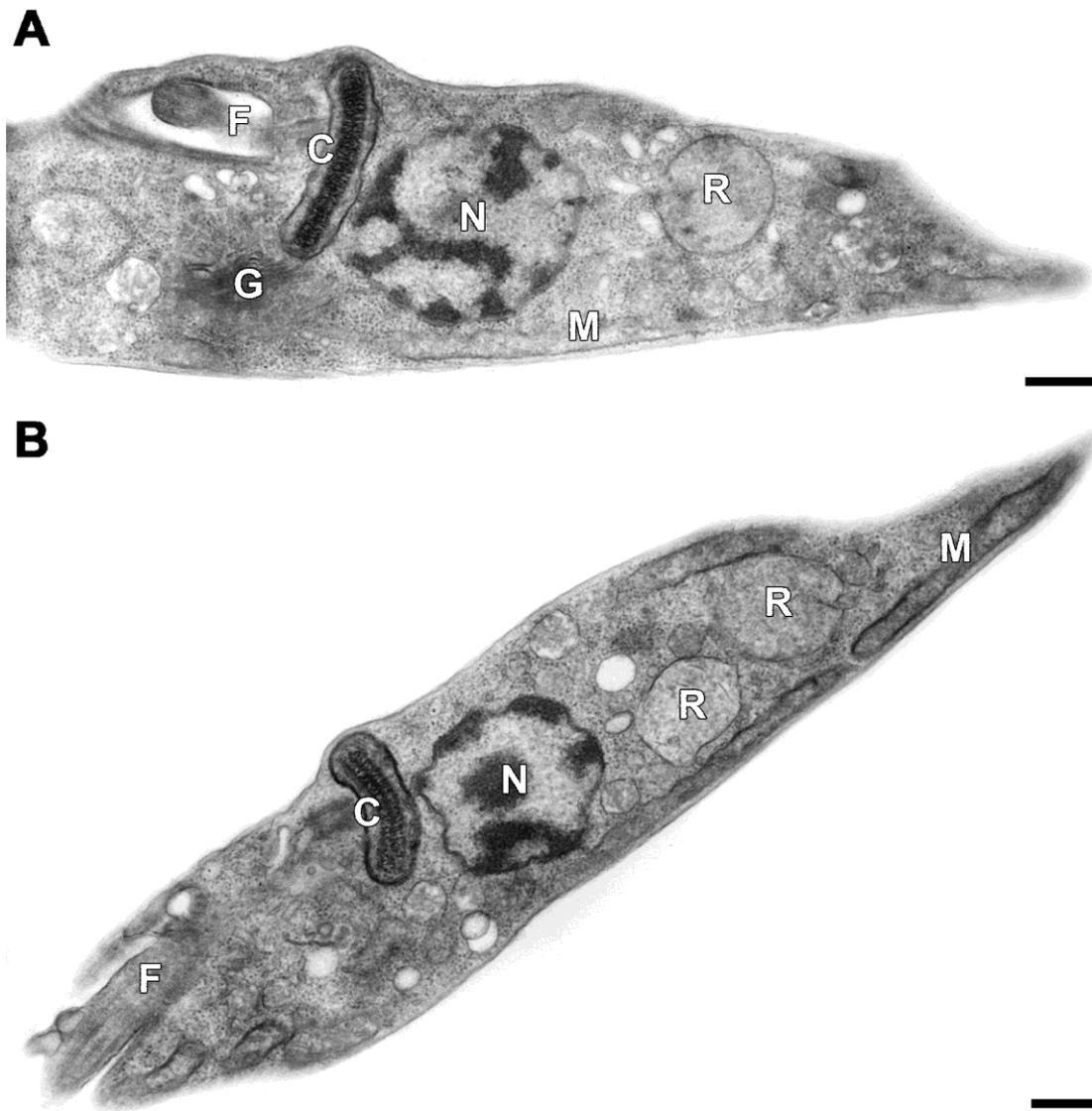


Figura 4.15. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* incubados por 96h em LIT pH7 + 10%SFB (A) e 20%SFB (B). (A) Parasito controle apresentando morfologia típica. (B) O acréscimo de uma maior quantidade de SFB não induziu qualquer alteração morfológica no protozoário. M: mitocôndria; N: núcleo; C: cinetoplasto; G: Golgi; F: flagelo; R: reservosomos. Barras = 0,5 μm.

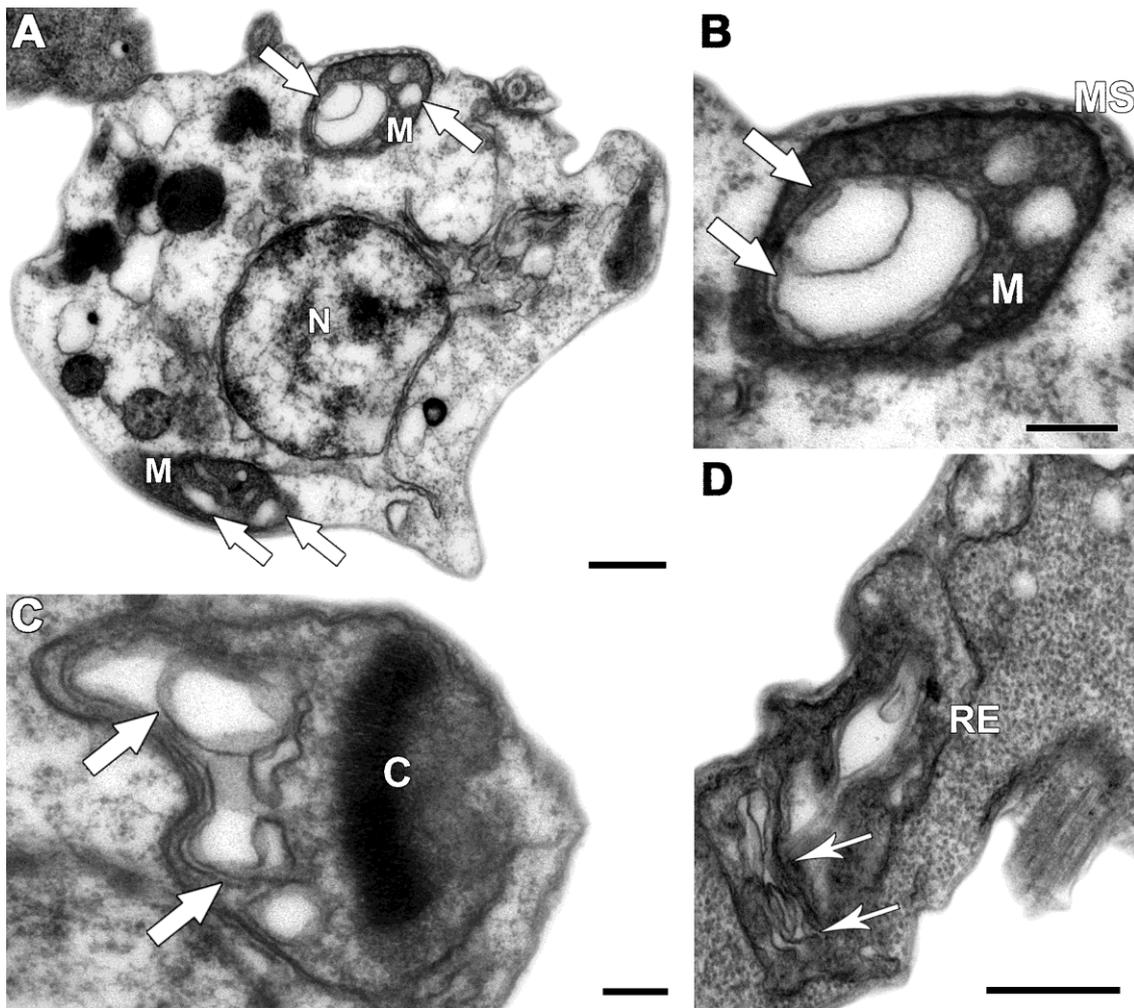


Figura 4.16. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* incubados por 96 h em LIT pH7 + 0%SFB. (A-D) Os parasitos apresentam estruturas membranares concêntricas no interior da mitocôndria (setas brancas largas) e no citosol (setas brancas finas). M: mitocôndria; N: núcleo; MS: microtúbulos subpeliculares; C: cinetoplasto; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 μm (A,D), 0,2 μm (B,C).

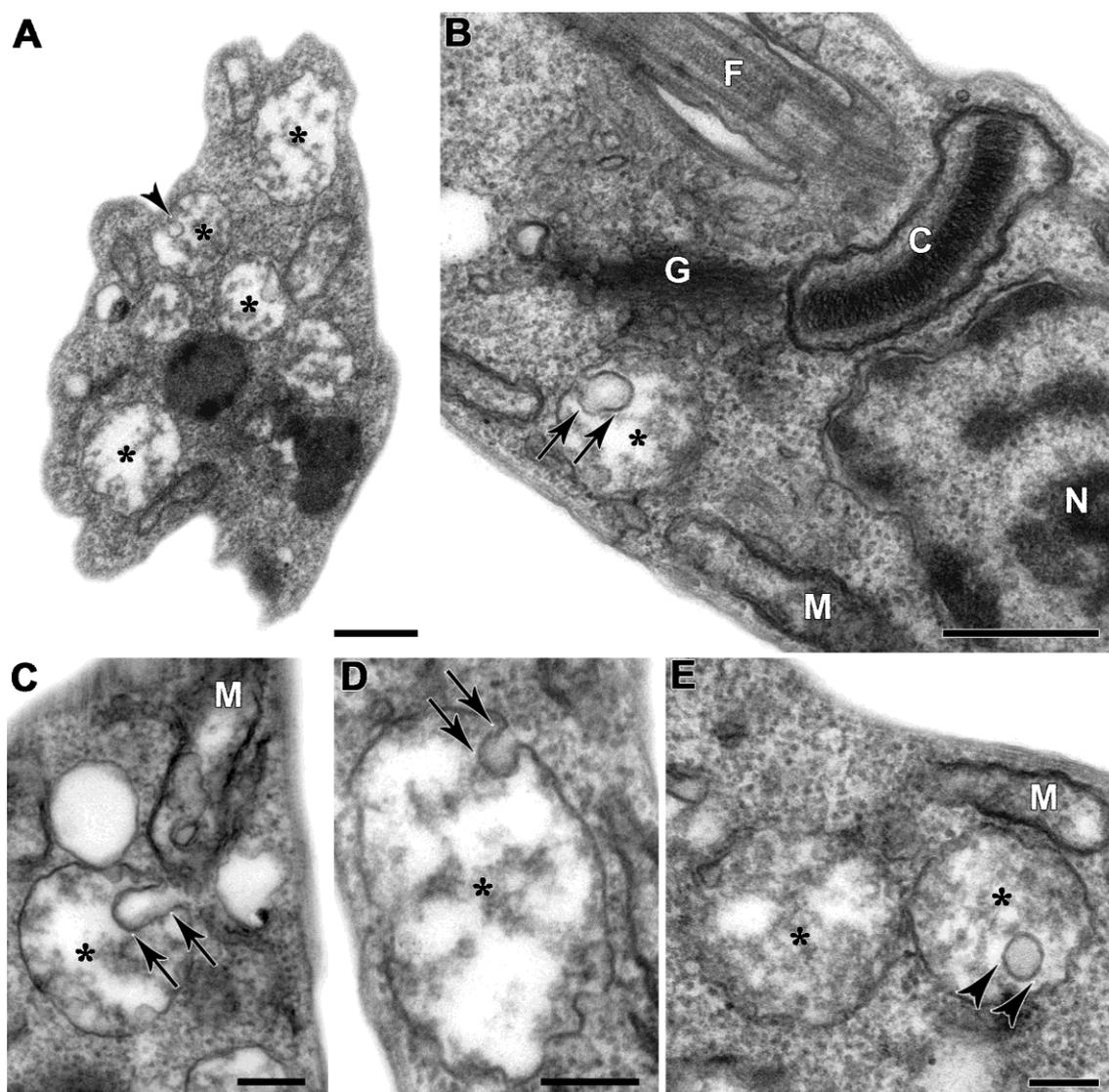


Figura 4.17. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* incubados por 96 h em LIT pH 7 + 0% SFB. **(A,B)** Os parasitos apresentam perda da eletrondensidade de reservosomos (asteriscos pretos), podendo conter invaginações da sua membrana (setas pretas) e estruturas membranares concêntricas no seu interior (cabeças de seta pretas). **(C,D)** Diversos estágios da invaginação da membrana (setas pretas) dos reservosomos pouco eletrondensos (asteriscos pretos) foram observados. **(E)** Detalhe das estruturas membranares concêntricas no interior dos reservosomos (cabeças de setas pretas). M: mitocôndria; N: núcleo; C: cinetoplasto; G: Golgi; F: flagelo. Barras = 0,5 μm (**A, B**), 0,2 μm (**C-E**).

A incubação de epimastigotas em meio LIT em pH ácido por 96 h induziu o aparecimento de reservosomos menos eletrondensos contendo muitas vezes estruturas membranares concêntricas em seu interior. Estruturas membranares semelhantes também foram encontradas no citosol. Os parasitos ainda apresentaram perfis de retículo endoplasmático e de Golgi envolvendo estruturas celulares e/ou organelas. Assim como na ausência de SFB, a acidificação do meio de cultura induziu importantes alterações morfológicas na mitocôndria do *T. cruzi* como a dilatação da organela e aparecimento de cristas desestruturadas (**Figura 4.18**). Por sua vez, o pH básico do LIT também levou a formação de perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas, inchaço mitocondrial, desorganização da organela com aparecimento de estruturas membranares concêntricas no seu interior, além da perda de elétron-densidade de reservosomos, formação de estruturas membranares concêntricas no citosol e intensa vacuolização e degradação citoplasmáticas (**Figura 4.19**).

É importante ressaltar ainda que após 96 h, a análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas submetidos a todas as condições de estresse de pH e nutricional testadas não apontou alterações morfológicas de qualquer espécie na cromatina nuclear, bem como na membrana plasmática (**Figuras 4.15-19**).

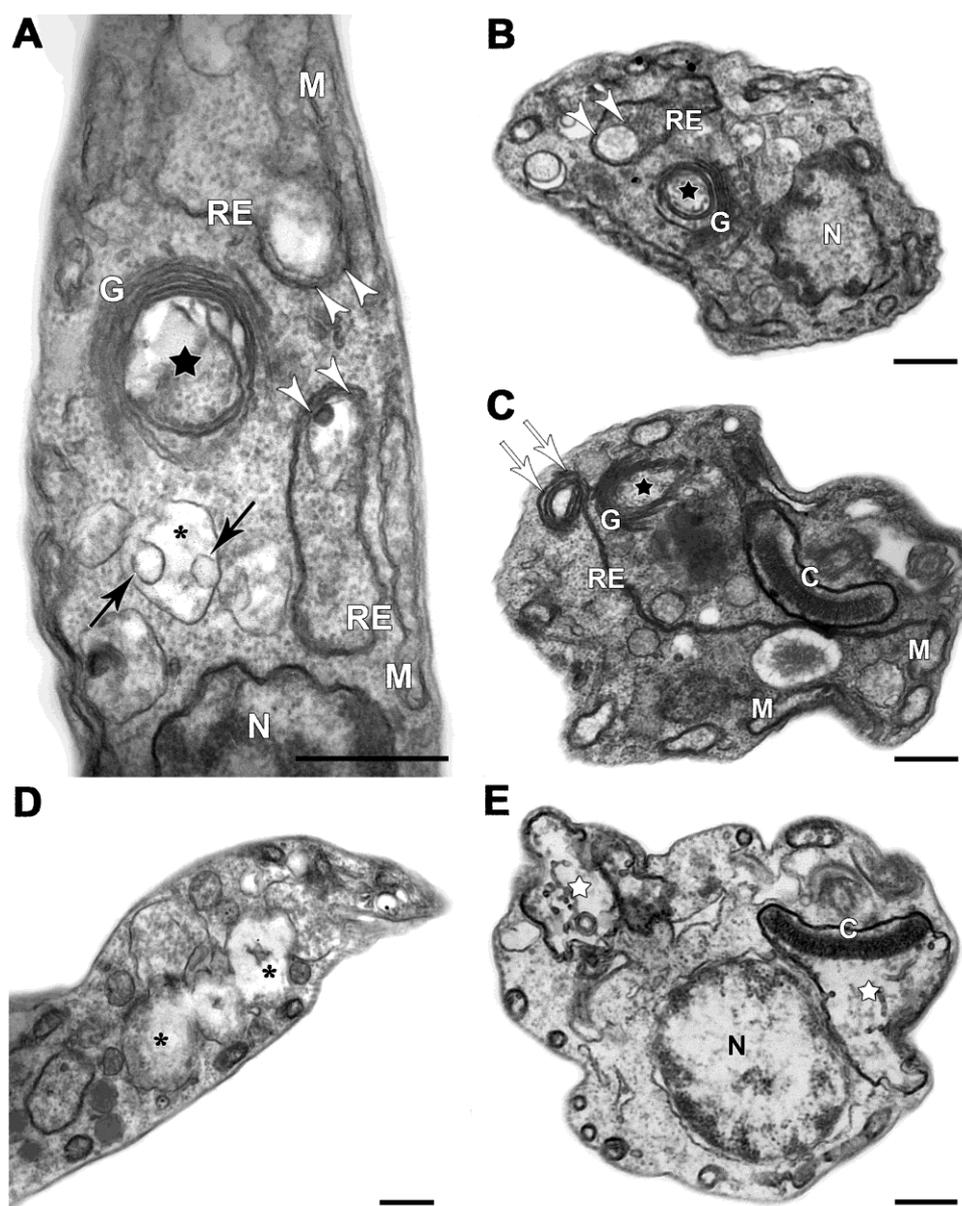


Figura 4.18. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* incubados por 96h em LIT ácido. (A-E) Os parasitos apresentam perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas (cabeças de seta brancas) (A-B), formação de estruturas membranares concêntricas no interior de reservosomos (setas pretas) com perda de eletrondensidade (asteriscos pretos) e também no citosol (setas brancas) (C). A acidificação do meio, ainda induziu o aparecimento de perfis de Golgi atípicos envolvendo porções do citoplasma (estrelas pretas) (A-C) além de um inchaço mitocondrial com intensa desorganização das cristas (estrelas brancas) (E). M: mitocôndria; N: núcleo; RE: retículo endoplasmático; G: Golgi; C: cinetoplasto. Barras = 0,5 μm .

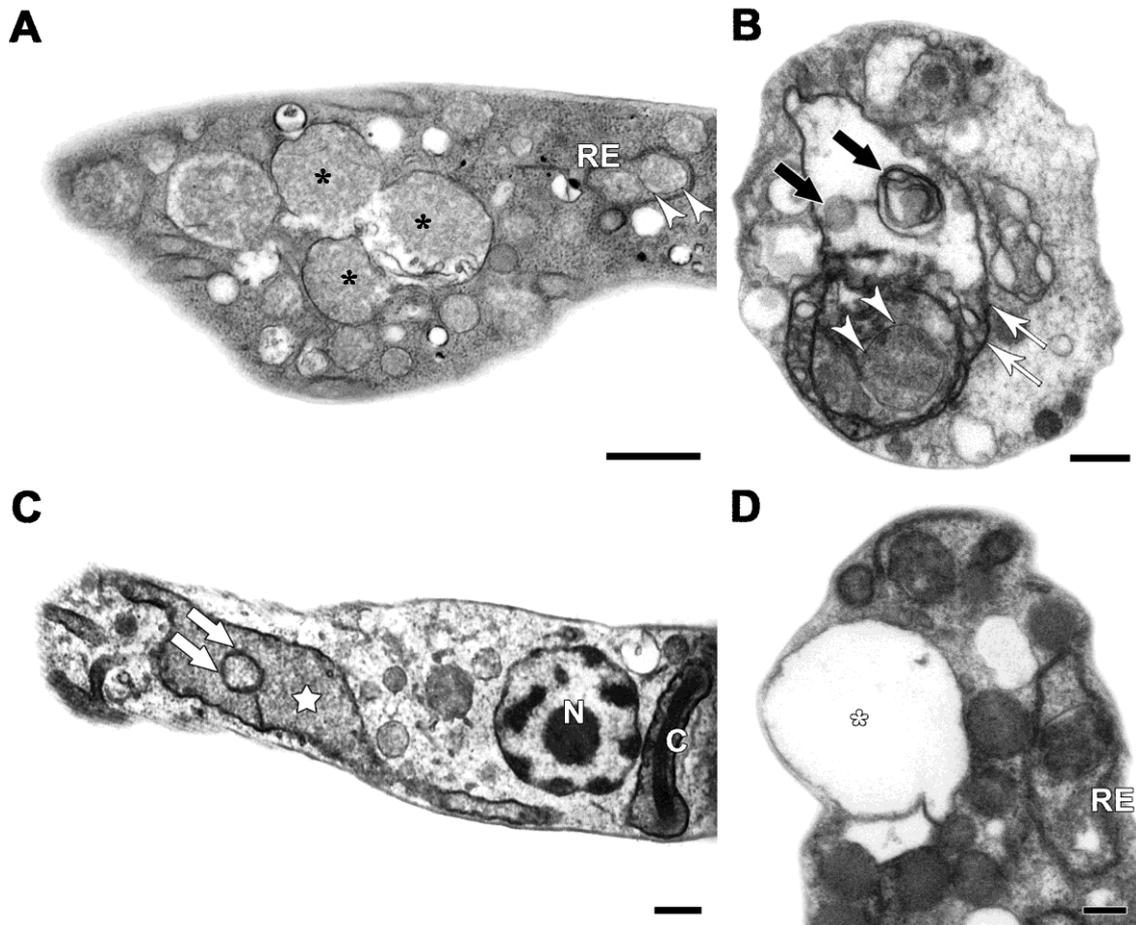


Figura 4.19. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* incubados por 96h em LIT com pH básico. **(A, B)** Os parasitos apresentam perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas (cabeças de seta brancas) **(A, B)**, perda de eletrondensidade de reservosomos (asteriscos pretos) **(A)**, formação de estruturas membranares concêntricas citosólicas (setas brancas finas) **(B)** e o aparecimento de material celular em diferentes estágios de degradação (setas pretas largas) **(B)**. **(C,D)** A alcalinização do meio ainda promoveu um inchaço mitocondrial (estrela branca) **(C)** com o aparecimento de estruturas membranares concêntricas no interior da organela (setas largas brancas) **(C)**, intensa vacuolização citoplasmática (asterisco branco) **(D)** e perfis de retículo endoplasmático (RE) envolvendo organelas. N: núcleo; C: cinetoplasto. Barras = 0,5 μm **(A-C)**, 1 μm **(D)**.

5. DISCUSSÃO

As naftoquinonas representam uma classe de moléculas com estrutura química que facilita reações de oxido-redução na célula, levando a diferentes efeitos biológicos. Especificamente a lausona é uma naftoquinona natural com atividades bactericida e moluscicida já descritas (Camara et al, 2008; Rahmoun et al, 2012). Hidroxinaftoquinonas derivadas de lausona tiveram a atividade anti-*T. cruzi* avaliada visando correlação com a estrutura química. Os compostos obtidos da reação de lausona com piridinocarboxialdeído foram os mais ativos dentre os derivados testados.

Outra característica importante para a atividade tripanocida foi o tamanho da cadeia lateral alifática ligada ao grupamento amino. A análise comparativa entre hidroxinaftoquinonas com estruturas químicas semelhantes, diferindo apenas no tamanho da cadeia lateral alifática (número de carbonos), revelou que esta atividade tripanocida é proporcional ao tamanho da cadeia. A naftoquinona **1C** (10 carbonos) foi a mais ativa, seguida pela **1B** (7 carbonos) e **1A** (4 carbonos). Correlação similar entre a estrutura-atividade foi observada entre o composto mais ativo **2C** (10 carbonos), **2A** (4 carbonos) e **2B** (7 carbonos). Nossos resultados sugerem que atividade tripanocida observada é dependente do tamanho mínimo da cadeia lateral de 10 carbonos. Esse fato pode ser explicado pelo caráter lipofílico da molécula, caracterizando-se pela maior permeabilidade à membrana do parasito dos compostos com longas cadeias laterais alifáticas (Moura et al, 2001). A naftoquinona **1C** apresentou ainda uma maior atividade que **2C**, sugerindo que a ação tripanocida deste composto envolva a capacidade do anel piridina de mediar reações de oxidação-redução. Contudo, como os ensaios de Azul de Alamar revelaram citotoxicidade dos compostos mais ativos (**1C**, **1B** e **2C**) para as células hospedeiras, sendo necessária a síntese de novos derivados que apresentem características hidrofóbicas mas com menor toxicidade para as células de mamíferos.

Dentro desta mesma linha de trabalho, nosso grupo vem investigando atividade tripanocida de outros grupos de quinonas (Silva et al, 2006; Silva Jr et al, 2008a,b, 2010, 2012; Ferreira et al, 2011), como por exemplo as naftoquinonas triazólicas. Dentre os compostos testados, o derivado de nor- β -lapachona **NT** que apresenta o grupamento 1,2,3 fenil-triazólico no anel

quinoidal, foi o mais ativo sobre tripomastigotas de *T. cruzi* com valor de $IC_{50}/24$ h = $17,3 \pm 2,0$ μ M (Silva Jr, et al, 2008b). Na ausência de sangue murino, o $IC_{50}/24$ h de **NT** foi $23,3 \pm 2,8$ μ M, sendo semelhante ao valor obtido na presença de sangue. Entretanto, a incubação prévia do **NT** com a mesma concentração de sangue por 2 h levou a um aumento significativo ($IC_{50}/24$ h = $33,7 \pm 4,8$ μ M) (dados não publicados), confirmando fenômeno já relatado anteriormente com outras naftoquinonas e pode ser explicado pela interação de naftoquinonas com proteínas séricas (Lopes et al, 1978). **NT** mostrou-se mais ativo sobre as formas proliferativas do parasito, sendo a forma amastigota intracelular mais sensível, possivelmente devido à potencialização do efeito do composto por propriedades microbicidas dos macrófagos.

Acredita-se que os efeitos de naftoquinonas e derivados sobre o *T. cruzi* são decorrentes da capacidade destas moléculas de gerar radicais livres, tendo como principal alvo a mitocôndria (Docampo et al, 1978a, Menna-Barreto et al, 2005, 2007 e 2009a). Nossos dados de citometria de fluxo demonstraram que o $\Delta\Psi_m$ não foi afetado pelo tratamento com **NT**, assim como a produção de EROs, confirmados pela ausência de danos ultraestruturais na mitocôndria. Anteriormente, foi demonstrado que naftopirano- e naftofuranoquinonas induziam a produção de EROs em *T. cruzi*, causando um aumento de danos morfológicos na mitocôndria (Docampo et al, 1978b; Menna-Barreto et al, 2009a,c). A análise por microscopia eletrônica de transmissão ainda apontou outros alvos de **NT** como reservosomos, Golgi e membrana flagelar. O principal efeito ultraestrutural desta naftoquinona foi o aparecimento de perfis de retículo endoplasmático envolvendo estruturas subcelulares e organelas principalmente reservosomos e a também recorrente formação de estruturas membranares concêntricas no citosol, são características comuns em processos autofágicos (Uzcátegui et al, 2007; Menna-Barreto et al, 2009a,b,c; Giordani et al, 2011). A análise ultraestrutural sugere que a membrana que forma a estrutura pré-autofagosomal (PAS) tenha origem da membrana do retículo endoplasmático (Mari et al, 2011). No entanto, não pode ser descartada que a desorganização do Golgi causada pelo tratamento com **NT** pode estar relacionada à participação desta organela na formação da PAS como já proposto em leveduras (van der Vaart & Reggiori, 2010).

O tratamento com **NT** induziu o aumento do percentual de epimastigotas marcados com MDC (marcador fluorescente de vacúolos autofágicos), reforçando a hipótese da participação do processo autofágico no mecanismo de ação de **NT**. Estudos mostram drogas de diferentes classes disparam a via autofágica em tripanosomatídeos, particularmente naftoquinonas e derivados sobre *T. cruzi*, gerando um aumento no número de transcritos de ATG3, ATG4, ATG7 e ATG8 (Menna-Barreto et al, 2009b; Duskenzo et al, 2011). Menna-Barreto e colaboradores (2009b) ainda observaram uma reversão do efeito tripanocida de derivados de β -lapachona quando pré-incubados com os inibidores de autofagia wortmanina e 3-metiladenina, indicando um possível papel desta via no mecanismo de morte de epimastigotas e tripomastigotas tratados com os compostos. Outros tripanosomatídeos tratados com peptídeos antimicrobianos e rapamicina também apresentaram características de autofagia (Bera et al, 2003; Barquilla et al, 2008), demonstrando aumento de vacúolos autofágicos e alterações morfológicas típicas, semelhantes às discutidas no presente trabalho em *T. cruzi* após o tratamento com **NT**.

A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou o surgimento de múltiplos flagelos em epimastigotas tratados com **NT**, sugerindo um bloqueio da mitose. Para confirmar esta hipótese, ensaios de citometria de fluxo foram realizados, demonstrando que **NT** induz uma significativa redução no percentual de epimastigotas com DNA duplicado e assim, o efeito desta naftoquinona ocorreria antes dos eventos de duplicação do material genético e citocinese. O tratamento com drogas que afetam o citoesqueleto induziram alterações similares (Jordan & Wilson, 1999; Menna-Barreto et al, 2009b). Em *T. brucei*, o composto dihidroxiacetona leva ao bloqueio do ciclo celular e aparecimento de características morfológicas autofágicas (Uczátegui et al, 2007). Com base nos resultados obtidos, a autofagia parece ser o principal mecanismo de ação de **NT**. Entretanto, a via autofágica também participa de mecanismos de resposta a estresse de forma mais ampla, sobretudo o nutricional. A análise por microscopia eletrônica de epimastigotas submetidos a estresses nutricional e de pH apontou características semelhantes as observadas após o tratamento com esta naftoquinona, nos estimulando a investigar mais a fundo esta via.

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve três diferentes formas do parasito, além de dois hospedeiros: vertebrado e invertebrado. Nesse contexto, o protozoário é exposto a condições físico-químicas extremas. No lúmen do intestino do vetor, inúmeros fatores de estresse podem atuar sobre o epimastigota como a ação de enzimas digestivas, variação de pH e escassez nutricional. Essas condições como a intensa oscilação de pH observada na urina e fezes do triatomíneo (Kollien et al, 2001), é crucial para o desenvolvimento parasitário, bem como para a ocorrência de processos como a metaciclogênese. Portanto, o sucesso da infecção depende da capacidade do epimastigota de sobreviver a estas condições, podendo a autofagia representar um mecanismo importante nestas etapas da vida do parasito. Sob ponto de vista biológico, essa hipótese tem respaldo considerando-se que a autofagia é um mecanismo constitutivo em todas as células eucarióticas e está associada à manutenção da homeostase e sobrevivência em situações de estresse, gerando substratos energéticos a partir da degradação de macromoléculas e/ou estruturas subcelulares (Yamada & Singh, 2012; Morita & Yoshimori, 2012).

Estudos anteriores demonstraram a diminuição do número de trofozoítos de *G. lamblia* submetidos ao tratamento com a naftoquinona β -lapachona ou estresse nutricional; tripomastigotas sanguíneos de *T. brucei* tratados com neuropeptídeos; e ainda após a incubação de promastigotas de *L. amazonensis* com elatol (Corrêa et al, 2009; Delgado et al, 2009; Dos Santos et al, 2010). A análise cinética da proliferação de epimastigotas em meio ácido ou básico causou uma redução similar no número de parasitos, efeito semelhante ao observado na ausência de soro nas condições de pH fisiológico.

Visando caracterizar fenotipicamente os epimastigotas sob estresse (nutricional e de pH), foi empregada a técnica de citometria de fluxo. Inicialmente, a análise da morfologia dos protozoários na condição ácida demonstrou o aparecimento de uma subpopulação caracterizada pela maior granulosidade, sugerindo uma vacuolização nos parasitos, fenômeno esse já observado em outros tipos celulares após a incubação com agentes indutores de autofagia (Bera et al, 2003). A discreta marcação de IP detectada em todas as condições estudadas indica a manutenção da integridade da membrana plasmática, principal característica de necrose. A avaliação por eletroforese

demonstrou a ausência de fragmentação do material genético, não sendo detectado padrão de bandejamento em escada ou arraste, indicativos de apoptose-like e necrose, respectivamente (Zong & Thompson, 2006; Khademvatan et al, 2011). Assim, nossos dados sugerem fortemente que outro mecanismo de morte celular está associado aos estresses nutricional e de pH no *T. cruzi*.

Após 96 h, os danos ultraestruturais mais comuns induzidos pelas variações de pH e escassez de nutrientes foram: a formação de estruturas membranares concêntricas no citosol e no interior de organelas como reservosomos e mitocôndria. Nas três condições experimentais, a mitocôndria foi bastante afetada, estando dilatada e com as suas cristas desorganizadas. O efeito direto sobre esta organela foi confirmado através da perda do $\Delta\Psi_m$ evidenciada pela marcação com TMRE. No entanto, esta redução na intensidade de fluorescência do marcador não foi observada nos epimastigotas submetidos a estresse nutricional. A produção de EROs foi avaliada através da marcação com DHE e análise por citometria de fluxo, evidenciando um aumento significativo no percentual de parasitos marcados após 96 h de incubação em meio ácido, básico ou 0% SFB. Estudos prévios em células tumorais apontam a participação de espécies reativas de oxigênio na sinalização da via autofágica (revisto em Essick & Sam, 2010), sugerindo o envolvimento deste aumento observado nos nossos dados na via. Entretanto, esta hipótese ainda precisa ser confirmada.

Durante a fosforilação oxidativa, o tráfego de elétrons através da cadeia transportadora mitocondrial gera uma diferença de potencial eletroquímico ($\Delta\Psi_m$), sendo o destino final do elétron, o oxigênio molecular ligado ao complexo IV. Entretanto, o vazamento de elétrons da cadeia leva à formação de espécies reativas como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, e ainda a uma redução do $\Delta\Psi_m$ (Turrens, 2003). Dessa forma, o aumento da produção de EROs e diminuição do $\Delta\Psi_m$ observado nos parasitos submetidos a estresse de pH podem estar associados ao dano mitocondrial, sugerindo alteração na fisiologia da organela. Interessantemente, a ausência de suplementação do meio LIT com SFB levou apenas a uma discreta geração de EROs em 96 h em comparação com os estresses ácido e básico. Assim, é

possível que a ausência de efeito no $\Delta\Psi_m$ durante a escassez de nutrientes seja decorrente da intensidade do estresse empregado. Como previamente descrito, a incubação de epimastigotas na ausência total de nutrientes permite a obtenção de um fenótipo mais intenso de autofagia, entretanto interfere fortemente na viabilidade do parasito em tempos superiores à 16 h (Alvarez et al, 2008a). A escolha por uma condição menos agressiva de estresse possibilitou um estudo cinético mais amplo, apesar de experimentos adicionais bioquímicos e moleculares serem necessários para melhor caracterizar o efeito da ausência de nutrientes sobre a mitocôndria.

O aparecimento de estruturas membranares concêntricas e a vacuolização citoplasmática detectados em epimastigotas submetidos ao estresse de pH ou nutricional são características morfológicas típicas de macroautofagia em células eucarióticas (Uczátegui et al, 2007). No entanto, ainda não se sabe ao certo a origem da PAS, sendo sugerido o retículo endoplasmático e/ou o Golgi como fonte dessa membrana, justificando a presença de perfis dessas organelas envolvendo estruturas subcelulares durante o processo autofágico (Mari et al, 2011). Nossos dados morfológicos sugerem que a fonte da PAS no *T. cruzi* pode ser dependente da condição na qual o parasito está exposto, tendo sido observado perfis de Golgi apenas em meio ácido. Estudos prévios por microscopia eletrônica apontaram para o envolvimento da autofagia durante a diferenciação de parasitos como *Leishmania sp* e *T. cruzi* (Waller & McConville, 2002; Besteiro et al, 2007). O aparecimento do fenótipo autofágico descrito nas condições de escassez nutricional e estresse de pH foi reforçado através do aumento do percentual de epimastigotas marcados com MDC por microscopia de fluorescência, indicando a participação desta via como resposta ao estresse. Correlação similar entre o perfil ultraestrutural de autofagia e marcação com MDC foi anteriormente relatado em tripanosomatídeos expostos a diferentes condições de estresse como o tratamento com drogas (Jimenez et al, 2008; Menna-Barreto et al, 2009c).

Em relação aos tipos de autofagia, apenas a macroautofagia foi descrita até o momento em protozoários (Kiel, 2010; Duszenko et al, 2011). Após a indução de estresse nutricional, os epimastigotas apresentaram invaginações nos reservosomos morfologicamente semelhantes às encontradas em

situações descritas como microautofagia em leveduras (Li et al, 2012). Durante esse processo, o material citosólico é englobado pelo vacúolo ou lisosomo e é degradado sem a formação de autofagossomo. De acordo com a literatura atual, os reservosomos possuem características ácidas e enzimas proteolíticas podendo ser considerados lisosomos-*like* (Porto-Carrero et al, 2000; Pereira et al, 2011). Dessa forma, é plausível que a presença de invaginações nesta organela possa estar associada à degradação de conteúdo citoplasmático. Com base apenas nos nossos dados ultraestruturais, este é o primeiro relato de microautofagia em protozoários, sendo necessários estudos bioquímicos mais aprofundados, incluindo a descrição das moléculas envolvidas.

Durante o ciclo do parasito, os epimastigotas encontram-se aderidos a superfície do intestino dos triatomíneos. Nesse microambiente, diferentes modificações ocorrem nos reservosomos do protozoário como a sua acidificação, ativação de proteases e degradação de seu conteúdo durante a metaciclogênese (Urbina, 1994; Soares et al, 1999). Esse processo é estimulado por diversos fatores como estresse nutricional, pH, osmolaridade e componentes da hemolinfa (Kollien & Schaub, 2000), entretanto a resposta desencadeada quando o parasito é submetido a situações de estresse ainda é pouco entendido. Nossas condições experimentais tentaram refletir *in vitro* o microambiente no qual o parasito está inserido no vetor. Como já mencionado anteriormente, tanto nas variações de pH quanto na ausência de nutrientes, observamos perfis de retículo endoplasmático envolvendo reservosomos, indicativo de ativação de autofagia.

A suposta macroautofagia desta organela pode ser um dos fatores responsáveis pelo seu desaparecimento durante a diferenciação do parasito e pelo provimento de substratos energéticos para sobrevivência durante períodos de falta de nutrientes. Alvarez e colaboradores (2008a) mostraram que durante a metaciclogênese há um aumento na expressão de Atg8 (proteína importante para a formação e expansão da PAS) em epimastigotas, seguida pela diminuição desta molécula em tripomastigotas metacíclicos, correlacionando o desaparecimento dos reservosomos ao processo autofágico.

A macroautofagia envolve um sistema autofagossomo-lisosomo e está relacionada à sustentação do balanço energético e reciclagem de estruturas subcelulares mantendo a homeostase em condições fisiológicas e em situações

de estresse. No entanto, uma exacerbação da via causa desequilíbrio, podendo levar à morte da célula. Dessa forma, a autofagia parece desempenhar duas funções bem distintas no *T. cruzi*: ora está relacionada à sobrevivência do protozoário envolvida em mecanismos como a sua diferenciação (Alvarez et al, 2008a,b), ora participa diretamente da via de morte disparada pelo tratamento com drogas, como no caso de parasitos incubados com derivados de naftoquinonas (Menna-Barreto et al, 2009a,b). Neste último caso, o ensaio de reversão do efeito tripanocida através da utilização de inibidores farmacológicos da via autofágica foi determinante para a correlação da autofagia com a morte celular induzida pelos compostos.

Nossos dados mostraram que tanto o tratamento de epimastigotas com **NT** quanto a indução de estresses de pH e escassez nutricional levaram ao fenótipo de autofagia e uma diminuição do número de parasitos. A ativação desta via gera como consequência a sobrevivência ou a morte celular, entretanto a falta de ferramentas adequadas impede a caracterização com precisão do papel citoprotetor ou citotóxico da autofagia nas diferentes condições experimentais.

6. CONCLUSÕES

1. A correlação da atividade *in vitro* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* com a estrutura das naftoquinonas indica associação entre esta atividade e o tamanho da cadeia alifática lateral (**1B**, **1C** e **2C**).
2. **NT** não leva a alterações na mitocôndria de epimastigotas de *T. cruzi*, porém um processo autofágico parece estar envolvido com o mecanismo de ação deste composto devido ao aumento de vacúolos autofágicos e ao aparecimento de perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas, desorganização do Golgi, e estruturas membranares concêntricas no citosol.
3. A avaliação da integridade de membrana plasmática assim como a ausência de fragmentação de DNA permite excluir processos de apoptose e necrose como principal mecanismo dos estresses induzidos em epimastigotas de *T. cruzi*.
4. Epimastigotas mantidos em pH ácido ou básico apresentaram uma redução do $\Delta\Psi_m$ e aumento da produção de EROs. Já os parasitos submetidos à escassez nutricional aumentaram a produção destas espécies reativas após 96 h de incubação.
5. Estas condições de estresse induziram alterações ultraestruturais como:
(a) perfis de retículo endoplasmático e Golgi envolvendo organelas;
(b) aparecimento de estruturas membranares concêntricas no citosol e no interior de organelas; (c) invaginação da membrana de reservosomos, fenótipos característicos de autofagia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altclas JD, Barcan L, Nagel C, Lattes R, Riarte A. Organ transplantation and Chagas disease. *JAMA* 2008;299:1134-1135.
- Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2008a;283:3454-3464.
- Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy* 2008b;4:361-363.
- Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, de Almeida MC, Reis JN, Santos VC, Valadares HM, dos Reis MG, Macedo AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:948-956.
- Angheben A, Anselmi M, Gobbi F, Marocco S, Monteiro G, Buonfrate D, Tais S, Talamo M, Zavarise G, Strohmeyer M, Bartalesi F, Mantella A, Di Tommaso M, Aiello Kh, Veneruso G, Graziani G, Ferrari M, Spreafico I, Bonifacio E, Gaiera G, Lanzafame M, Mascarello M, Cancrini G, Albajar-Vinas P, Bisoffi Z, Bartoloni A. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. *Euro Surveill* 2011;16:pii 19969.
- Arenas P. Medicine and magic among the Maka Indians of the Paraguayan Chaco. *J Ethnopharmacol* 1987;21:279-295.
- Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 2005;309:473-476.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004;101:2034-2039.
- Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 3;105:14579-14584.
- Bastien JW. Pharmacopeia of Qollahuaya Andeans. *J Ethnopharmacol* 1983;8:97-111.
- Bayer Healthcare. Fight against Chagas Disease. <http://www.globalhealthprogress.org/programs/bayer-healthcare-fight-against-chagas-disease> (acesso em 6 Jul, 2012).
- Bejarano E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 2010;7:29-39.
- Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchan Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepcion JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem* 2006;49:892-899.

- Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasitol* 2003;127:23-35.
- Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 2011;364:2527-2534.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 2007;298:2171-2181.
- Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2009;49:e52-4.
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007;37:1063-1075.
- Besteiro S, Williams RAM, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem* 2006;281:11384-11396.
- Bittencourt AL. American trypanosomiasis (Chagas' disease) *Em: Parasitic infections in pregnancy and the newborn*. MacLeod (org), Oxford Med Pub, Oxford, 1988, p. 62-86.
- Boveris A, Stoppani AOM, Do Campo R, Cruz FS. Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 1978;61C:327-329.
- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1980;188:643-648.
- Brennand A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PAM. (2011) Autophagy in parasitic protist: unique features and drug target. *Mol Biochem Parasitol* 2011;177:83-99.
- Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol* 2007;23:376-383.
- Brunmark A, Cadenas E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad Biol Med* 1989;7:435-477.
- Buckner FS, Navabi N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:609-616.
- Burri C. Chemotherapy against human African trypanosomiasis: is there a road to success? *Parasitology* 2010;137:1987-1994.
- Camara CA, Silva TM, da-Silva TG, Martins RM, Barbosa TP, Pinto AC, Vargas MD. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. *An Acad Bras Cienc* 2008;80:329-334.
- Campos de Carvalho AC, Goldenberg RCS, Jelicks LA, Soares MBP, Dos Santos RR, Spray DC, Tanowitz HB. Cell therapy in Chagas disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009:1-6.

- Campos SV, Strabelli TM, Amato Neto V, Silva CP, Bacal F, Bocchi EA, Stolf NA. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:597-602.
- Cebollero E, van der Vaart A, Zhao M, Rieter E, Klionsky DJ, Helms JB, Reggiori F. Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr Biol* 2012, no prelo.
- Chagas C. Nova tripanosomíase humana Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* gen. nov. sp. nov., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;1:159-218.
- Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature* 2010;465:S12-5.
- Clinical Trials, 2012a Clinical Trials of US National Institutes of Health. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01162967?term=chagas+disease&rank=7>. Acesso em 12/05/2012.
- Clinical Trials, 2012b Clinical Trials of US National Institutes of Health. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489228?term=E1224&rank=1> acesso em 12/05/2012.
- Clinical Trials, 2012c. Clinical Trials of US National Institutes of Health. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00102700>, acesso em 1/4/ 2012.
- Comporti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact* 1989;72:1-56.
- Corrêa G, Vilela R, Menna-Barreto RF, Midlej V, Benchimol M. Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of β -lapachone and starvation. *Parasitol Int* 2009;58:424-437.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:113-122.
- Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:549-554.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl 1):31-40.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465:S6-7.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:641-645.
- Coura JR, Junqueira AC. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107:145-154.

- Cruz FS, Docampo R, Boveris A. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide from β -lapachone in bacteria. *Antimicrob Agents Chemoter* 1978;14:630-633.
- De Almeida ER, Silva Filho, A AA, Santos ER, Lopes CA. Antiinflammatory action of lapachol. *J Ethnopharmacol* 1990;29:239-241.
- De Castro SL, Pinto MCFR, Pinto AV. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*: I-Establishing a structure/activity relationship. *Microbios* 1994;78:83-90.
- De Castro SL, Batista DGJ, Batista MM, Batista W, Dailyri A, Souza EM, Menna-Barreto RFS, Oliveira GM, Salomão K, Silva CF, Silva PB, Soeiro MNC. Experimental chemotherapy for Chagas disease: a morphological, biochemical and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and naphthoquinones. *Mol Biol Int*, 2011;1-13.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 1955;60:604-617.
- De Souza W, Martinez-Palomo A, Gonzalez-Robbles A. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze-fracture. *J Cell Sci* 1978;33:285-299.
- De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 1984;86:197-283.
- De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis* 2002;1:1-21.
- De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Supl. 1):89-100.
- De Souza W, Attias M, Rodrigues JCF. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:2069-2080.
- Delgado M, Anderson P, Garcia-Salcedo JA, Caro M, Gonzalez-Rey E. Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell Death Diff* 2009;16:406-416.
- Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41:193-196.
- Dias JC, Amato Neto V, Luna EJ. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44:375-379.
- Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1988;44:880-881.
- Di Bartolomeo S, Nazio F, Cecconi F. The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic*. 2010;11:1280-1289.

- DNDi, 2012a. <http://www.dndi.org/index.php/nect.html?ids=3>, acesso em 15/05/2012
- DNDi 2012b <http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/2011/282-02-12-2011-chagas-na-infancia-tem-remedio.html>. acesso 12/05/2012.
- Docampo R, Moreno SNJ. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proceedings* 1986;45:2471-2476.
- Docampo R, Lopes JN, Cruz FS, Souza W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β - lapachone. *Exp Parasitol* 1977;42:142-149.
- Docampo R, Cruz FS, Boveris A, Muniz RP, Esquivel DM. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in β -lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Arch Biochem Biophys* 1978a;186:292-297.
- Docampo R, De Souza W, Cruz FS, Roitman I, Cover B, Gutteridge WE. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd* 1978b;57:189-198.
- Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:251-261.
- Docampo R, Ulrich P, Moreno SN. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:775-784.
- Dos Santos AO, Veiga-Santos P, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Sudatti DB, Bianco EM, Pereira RC, Nakamura CV. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Mar Drugs* 2010;8:2733-2743.
- Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* 2006;22:536-542.
- Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdron-Lopez M, Colombo M, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, De Castro SL, Menna-Barreto RFS, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Stoka V, Turk B, Michels PA. Autophagy in protists. *Autophagy* 2011;7:127-158.
- Essick EE, Sam F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3:168-77.
- Farré JC, Krick R, Subramani S, Thumm M. Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:522-530.
- Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:514-516.
- Ferreira VF, Ferreira SB, da Silva FC. Strategies for the synthesis of bioactive pyran naphthoquinones. *Org Biomol Chem* 2010;8:4793-4802.

- Ferreira SB, Gonzaga DTG, Santos WC, Araújo KGL, Ferreira VF. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Rev Virtual Quim* 2010;2:140-160.
- Field MC, Carrington M. The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:775-786.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:755-759.
- FIOCRUZ, 2012. Disponível em: www.fiocruz.br/chagas/ Acesso em: 31/08/2012
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 2010;115:22–27.
- Giordani RB, Vieira Pde B, Weizenmann M, Rosemberg DB, Souza AP, Bonorino C, De Carli GA, Bogo MR, Zuanazzi JA, Tasca T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* 2011;72:645-650.
- Goijman SG, Stoppani AOM. Effect of β -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:273-280.
- Goijman SG, Frasch ACC, Stoppani AOM. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1457-1461.
- Goldberg B, Stern A. Superoxide anion as a mediator of drug-induced oxidative hemolysis. *J Biol Chem*. 1976;251:6468-6470.
- Gonçalves RLS, Menna-Barreto RFS, Polycarpo CR, Gadelha FR, De Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr* 2011;43:651-661.
- Goulart MOF, Zani CL, Tonholo J, Freitas LR, Abreu FC, Oliveira AB, Raslan DS, Starling S, Chiari E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorg Med Chem* 1997;7:2043-2048.
- Guhl F, Vellejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 1999;108:401-407.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 2007;134:69-82.
- Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* 2012;286:13088-130895.

- Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012;56:115-123.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.
- Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ. Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy* 2006;2:107-118.
- Higuchi ML, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 2003;60:96-107.
- Ichimura Y, Komatsu M. Pathophysiological role of autophagy: lesson from autophagy-deficient mouse models. *Exp Anim.* 2011;60:329-345.
- Jackson Y, Chappuis F. Chagas disease in Switzerland: history and challenges. *Euro Surveill* 2011;16:1-10
- Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, Sztajzel J, Besse V, Loutan L, Gaspoz JM, Jannin J, Albajar Vinas P, Luquetti A, Chappuis F. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e592.
- Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:95-97.
- Jimenez V, Paredes R, Sosa MA, Galanti N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *J Cell Biochem.* 2008;105:688-698.
- Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011;7:279-296.
- Jordan MA, Wilson L. The use and action of drugs in analyzing mitosis. *Methods Cell Biol* 1999;61:267-295.
- Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *Leishmania tropica* strains. *Korean J Parasitol* 2011;49:17-23.
- Kiel JA. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:819-830.
- Klaus V, Hartmann T, Gambini J, Graf P, Stahl W, Hartwig A, Klotz LO. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Arch Biochem Biophys* 2010;496:93-100.
- Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000;290:1717-1721.
- Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:931-937.

- Kocher C, Segerer S, Schleich A, Caduff R, Wyler LG, Müller V, Beck B, Blum J, Kamarachev J, Mueller NJ. Skin lesions, malaise, and heart failure in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2012;1-7.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* 2000;16:381-387.
- Kollien AH, Grospietsch T, Kleffmann T, Zerst-Boroffka I, Schaub GA. Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 2001;47:739-747.
- Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012; 52:221-47.
- Lafepe. Guia de Compras. 2º edição junho 2012.
- Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem J* 2012;441:523-540.
- Lemercier G, Dutoya S, Luo S, Ruiz FA, Rodrigues CO, Baltz T, Docampo R, Bakalara N. A vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2002;277:37369-37376.
- Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lanc Infect Dis* 2010;10:556-570.
- Li CJ, Averboukh L, Pardee AB. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 1993;268:22463-22468.
- Li WM, Yang QA, Mao ZX. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:749-763.
- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69:1125-1136.
- Lima NM, Correia CS, Leon LL, Machado GM, Madeira MF, Santana AE, Goulart MO. Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:757-761.
- Lopes JN, Cruz FS, Do Campo R, Vasconcellos ME, Sampaio MCR, Pinto AV, Gilbert B. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1978;72:523-531.
- Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res* 2010;43:323-331.
- Malekzadeh F. Antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* L. *Appl Microbiol* 1968;16:663-664.
- Manne J, Snively CS, Levy MZ, Reich MR. Supply chain problems for Chagas disease treatment. *Lancet Infect Dis* 2012;12:173-175.

- Mari M, Tooze SA, Reggiori F. The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *Biol Rep* 2011;3:25
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2008;156:37-43.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146:601-620.
- Meirelles MNL, Araujo-Jorge TC, Miranda CF, De Souza W, Barbosa HS. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *Eur J Cell Biol* 1986;41:198–206.
- Menna-Barreto RF, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a beta-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1034-1041.
- Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitol Res* 2007;101:895-905.
- Menna-Barreto RFS. Naftoquinonas e derivados: estudo da atividade, mecanismo de ação e indução de morte celular *em Trypanosoma cruzi*. [tese de doutorado] Rio de Janeiro (RJ): Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
- Menna-Barreto RFS, Gonçalves RLS, Costa EM, Silva RSF, Pinto AV, Oliveira MF, De Castro SL. The activity on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones is mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Rad Biol Med* 2009a;47:644-653.
- Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2009b;136:499-510.
- Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, De Castro SL. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 2009c;40:157-168.
- Menna-Barreto RF, Beghini DG, Ferreira AT, Pinto AV, De Castro SL, Perales J. *A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in Trypanosoma cruzi epimastigotes in vitro*. *J Proteomics*. 2010;73(12):2306-2315
- Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:1463-1477.

- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica de 29/03/2005. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs>, 2006, 2005. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21269 acesso em 22/06/12.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147:728-734.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular selfdigestion. *Nature* 2008;451:1069-1075.
- Moção (2011) Doença de Chagas: impacto mundial da interrupção da produção do benznidazol pelo Brasil: como contornar a crise de desabastecimento? Assembléia Geral da XXVII Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e e XV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. 28 de Outubro de 2011, Uberaba, Minas Gerais
- Molina Portela MP, Fernandez Villamil SH, Perissinotti LJ, Stoppani AOM. Redox cycling of *o*-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochem Pharmacol* 1996;52:1875-1882.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. 1):17-30.
- Moncayo A, Ortiz-Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100:663-677.
- Morello A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 1988;90C:1-12.
- Moreno SN, Docampo R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol* 2009;56:208-213.
- Morita E, Yoshimori T. Membrane recruitment of autophagy proteins in selective autophagy. *Hepatology Research* 2012;42:435-441.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55-63.
- Moura KC, Emery FS, Neves-Pinto C, Pinto MCFR, Dantas AP, Salomão K, De Castro SL, Pinto AV. Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. *J Braz Chem Soc* 2001;12:325-338.
- MSF 2011 The shortage of benznidazole leaves thousands of chagas patients without treatment, <http://doctorswithoutborders.com/press/release.cfm?id=5547&cat=press-release>. Acesso 12/07/2012.
- Munday R. Autoxidation of naphthohydroquinones: effects of pH, naphthoquinones and superoxide dismutase. *Free Rad Res* 2000;32:245-253.

- Munday R. Concerted action of DT-diaphorase and superoxide dismutase in preventing redox cycling of naphthoquinones: an evaluation. *Free Rad Res* 2001;35:145-158.
- Munday R. Activation and detoxification of naphthoquinones by NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Methods Enzymol* 2004;382:364-380.
- Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* 2012;14:634-643.
- Neves AP, Barbosa CC, Greco SJ, Vargas MD, Visentin LC, Pinheiro CB, Mangrich AS, Barbosa JP, da Costa GL. Novel aminonaphthoquinone mannich bases derived from lawsone and their copper (II) complexes: synthesis, characterization and antibacterial activity. *J Braz Chem Soc* 2009;20:712-727.
- Neves AP, da Silva GB, Vargas MD, Pinheiro CB, Visentin Ldo C, Filho JD, Araújo AJ, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, de Moraes MO. Novel platinum(II) complexes of 3-(aminomethyl)naphthoquinone Mannich bases: synthesis, crystal structure and cytotoxic activities. *Dalton Trans* 2010;39:10203-10216.
- Noireau F, Cortez MG, Monteiro FA, Jansen AM, Torrico F. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol* 2005;21:7-10.
- Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:941-955.
- O'Brien PJ. 1991. Molecular mechanism of quinone cytotoxicity. *Chem-Biol Interact* 1991;80:1-41.
- OMS. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2010. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
- Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 1977;80:360-364.
- Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell & Develop Biol* 2010;21:719-726.
- Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin* 2011;29:53-62.
- Parsons M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol*. 2004;53:717-724.
- Paulin JJ. The chondriome of selected trypanosomatids. A three dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. *J Cell Biol* 1975;66:404-413.
- Pehrson PO, Wahlgren M, Bengtsson E. Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old child. *Scand J Infect Dis* 1981;13:307-308.

- Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NN, Atella GC, de Souza W, Almeida IC, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. PLoS One 2011;6:e22359.
- Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Parola P, Jackson Y, Odolini S, Lopez-Velez R; EuroTravNet Network. EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. Euro Surveill 2011;16:pii 19966.
- Pinto AV, De Castro SL. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. Molecules 2009;14:4570-4590.
- Pinto AV, Ferreira VF, Capella RS, Gilbert B, Pinto MCR, Da Silva JS. Activity of some naphthoquinones on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1987;81:609-610.
- Pinto AV, Pinto MCFR, Oliveira CGT. Síntese das α - e β -norlapachonas, propriedades em meio ácido e reações com N-bromosuccinimida. An Acad Brasil Ciências 1982;54:107-114.
- Pinto AY, Valente SA, Valente Vda C, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:602-614.
- Polak A, Richle R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann Trop Med Parasitol 1978;72:228-232.
- Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. Eur J Cell Biol 2000;79:858-869.
- Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. Lancet 374;2009:56–64.
- Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. Exp Mol Med 2012;44:73-80.
- Rahmoun NM, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Benabdallah M, Villemin D, Choukchou-Braham N. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. Med Mal Infect. 2012;42:270-275.
- Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Amato VS, Rassi Júnior A, Luquetti AO, Rassi SG. A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. Rev Soc Bras Med Trop 2004;37:485-489.
- Rassi Jr A, Rassi A, Little WC. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N Engl J Med 2006;355:799-808.

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. I):152-158.
- Rassi Jr. A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375:1388–1402.
- Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 2002;1:11-21.
- Reithinger R, Tarleton R, Urbina JA, Kitron U, Gurtler RE. Eliminating Chagas disease. *BMJ* 2009;338:1044-1046.
- Rigden DJ, Herman M, Gillies S, Michels PA. Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans* 2005;33:972-974.
- Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2008;118:17-24.
- Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 2005;1:11-22.
- Sacau EP, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Ferro EA, Tokuda H, Mukainaka T, Nishino H. Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. *Bioorg Med Chem*. 2003;11:483-488.
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potalicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Develop Cell* 2011; 20:131-139.
- Santambrogio L, Cuervo AM. Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy* 2011;7:652-654.
- Schaub GA, Löscher P. *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. 1988;65:174-186.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102 (Suppl 1):75-85.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010;115:14–21.
- Schuerch AR, Wehrli W. beta-Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase-alpha. Inhibitory effect, thiol dependence and specificity. *Eur J Biochem*. 1978;84:197-205.
- Scott DA, Moreno SN, Docampo R. Ca²⁺ storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity. *Biochem J* 1995;310:789-794.
- Scott DA, DoCampo R, Dvorak JA, Shi S, Leapman RD. *In situ* compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1997;272:28020-28029.

- Shacka JJ, Roth KA, Zhang JH. The autophagy-lysosomal degradation pathway: role in neurodegenerative disease and therapy. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2008;13:718-736.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:117-143.
- Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Epidemiology of the first autochthonous cases of Chagas' disease recorded in Belém, Pará, Brazil. *Rev Saúde Pública* 1969;3:153-157.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, Amato Neto V, Tolezano JE, Peres BA, Arruda Júnior ER. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991;33:351-357.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012;54:845-852.
- Shpilka T, Elazar Z. Shedding light on mammalian microautophagy. *Develop Cell* 2011;20:1-2.
- Silva Jr EM, Souza MCBV, Fernandes MC, Menna-Barreto RFS, Pinto MCFR, Lopes FA, Simone CA, Andrade CK, Pinto AV, Ferreira VF, De Castro SL. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorganic Med Lett* 2008a;16:5030-5038.
- Silva Jr EM, Menna-Barreto RFS, Pinto MCFR, Silva RSF, Teixeira DV, Souza MCBV, de Simone CA, De Castro SL, Ferreira VF, Pinto AV. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem* 2008b;43:1774-1780.
- Silva Jr EM, Guimarães T, Menna-Barreto RFS, Pinto MCFR, de Simone CA, Pessoa C, Cavalcanti BC, Sabino JR, Andrade CKZ, Goulart MOF, De Castro SL, Pinto AV. The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorg Med Chem* 2010;18:3224-3230.
- Silva Jr EN, Melo IMM, Emilay B. T. Diogo EBT, Verence A. Costa VA, Souza Filho JD, Valença WO, Camara CA, Oliveira RN, Araujo AS, Emery FS, Santos MR, de Simone CA, Menna-Barreto RFS, De Castro SL. On the search of potential anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-amino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained from click reactions. *Eur J Med Chem* 2012;52:304-312.
- Silva LHP, Nussenszweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 1953;20:191-207.
- Silva NN, Clausell DT, Nolibos H, de Mello AL, Ossanai J, Rapone T, Snell T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968;10:265-276.
- Silva RSF, Costa EM, Trindade ULT, Teixeira DV, Pinto MCFR, Santos GL, Malta VRS, De Simone CA, Pinto AV, De Castro SL. Synthesis of

- naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. Eur J Med Chem 2006;41:526-530.
- Soares MJ, De Souza W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. J Submicrosc Cytol Pathol 1988;20:349-361.
- Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:139-141.
- Soares MJ. Endocytic portals in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. Parasitol Res 2006;99:321-322.
- Soares MJ, Souto-Pradrón T, De Souza W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. J Cell Sci 1992;102:157-167.
- Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;60:25-32.
- Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. Antioxidants & Redox Signaling 2011;14:2201-2214.
- Tapia RA, Salas C, Morello A, Maya JD, Toro-Labbe A. Synthesis of dihydronaphthofurandiones and dihydrofuroquinolinediones with trypanocidal activity and analysis of their stereoelectronic properties Bioorg Med Chem 2004;12:2451-2458.
- Till A, Lakhani R, Burnett SF, Subramani S. Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. Int J Cell Biol. 2012;512721:1-18.
- Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrice MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg. 2004;70:201-209.
- Trouiller P, Olliaro P, Torrele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. The Lancet 2002;359:2188-2194.
- Trujillo M, Budde H, Piñeyro MD, Stehr M, Robello C, Flohe L, Radi R. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. J Biol Chem 2004;279:34175-34182.
- Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. Cell Death Differ 2005;12:1528-1534.
- Tung YT, Wang BJ, Hu MK, Hsu WM, Lee H, Huang WP, Liao YF. Autophagy: A double-edged sword in Alzheimer's disease. Journal of Biosciences 2012;37:157-165.

- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552:335-344.
- Urbina JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1994;10:107-110.
- Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 2002;8:287-295.
- Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. 1):311-318.
- Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2379-2387.
- Uzcátegui NL, Carmona-Gutiérrez D, Denninger V, Schoenfeld C, Lang F, Figarella K, Duszenko M. Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3960-3968.
- Van der Vaart A, Reggiori F. The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes. *Autophagy* 2010;6:800-801.
- Viñas P, Jannin J. The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill* 2011;16:pii 19975.
- Waller RF, McConville MJ. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol* 2002;32:1435-1445.
- Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Ann Rev Biochem* 2011;80:125-156.
- Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem.* 2011;11:2072-2084.
- Yamada E, Singh R. Mapping autophagy on to your metabolic radar. *Diabetes* 2012;61:272-280.
- Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:9-14.
- Yuk JM, Yoshimori T, Jo EK. Autophagy and bacterial infectious diseases. *Exp Mol Med.* 2012;44:99-108.
- Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006;20:1-15.

8. ANEXO

A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*

M. C. FERNANDES¹, E. N. DA SILVA JR.², A. V. PINTO³†, S. L. DE CASTRO¹
and R. F. S. MENNA-BARRETO¹*

¹Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

²Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

³Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-970, Brazil

(Received 14 June 2011; revised 9 August 2011; accepted 14 August 2011; first published online 23 September 2011)

SUMMARY

Chagas' disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, represents a serious health problem in Latin America, and the available chemotherapy, which is based on 2 nitro-derivatives, is not satisfactory. In folk medicine, natural products including naphthoquinones have been employed for the treatment of different parasitic diseases. In the pursuit of alternative drugs for Chagas' disease, we investigated the mechanism of action of the triazolic naphthoquinone (TN; 2,2-dimethyl-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione), which is the most active compound against *T. cruzi* trypomastigotes among a series of naphthofuranquinones. TN was active against the 3 parasite forms producing a dose-dependent inhibitory effect. In epimastigotes, TN induced reservosome disruption, flagellar blebbing, Golgi disorganization, the presence of cytosolic concentric membrane structures and abnormal multiflagellar parasites. The treatment also led to the appearance of well-developed endoplasmic reticulum profiles surrounding organelles that associated with an increase in monodansylcadaverine labelling, suggesting autophagy as part of the TN mechanism of action. Interestingly, no ultrastructural damage was detected in the mitochondria of naphthoquinone-treated epimastigotes. Flow cytometric analysis demonstrated an impairment of mitosis, an increase in ROS production and the maintenance of mitochondrial membrane potential. TN could be a good starting point in the investigation of a chemotherapeutic approach for the treatment of Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, chemotherapy, naphthoquinones, autophagy, mitosis, reactive oxygen species.

INTRODUCTION

Chagas' disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, represents a serious health problem in Latin America (Rassi *et al.* 2010). This disease has been recognized as an opportunistic disease in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals (Vaidian *et al.* 2004) and is emerging in non-endemic areas because of international immigration (Schmunis, 2007). The life cycle of *T. cruzi* involves a haematophagous triatomine insect, a vertebrate host, and different parasitic forms. Briefly, a bloodstream trypomastigote ingested by the insect differentiates into an epimastigote, which proliferates and, in the posterior intestine, differentiates into the metacyclic form. This infective form invades the vertebrate cell and undergoes differentiation into an intracellular amastigote, which

proliferates and then transforms into a trypomastigote, the *T. cruzi* form that causes the infection.

T. cruzi and other trypanosomatids present several peculiar morphological and biochemical characteristics, including the presence of a single mitochondrion equipped with a branched electron-transport chain and the kinetoplast – a DNA-rich specialized region – which is a hallmark of kinetoplastid protozoa (Menna-Barreto *et al.* 2009a). Oxidative phosphorylation, which is localized in the inner membrane of this organelle, represents a key checkpoint in the redox balance since it is the main source of reactive oxygen species (ROS) in the parasite. The partial reduction of molecular oxygen to superoxide and its subsequent dismutation to hydrogen peroxide, which is toxic to the protozoa, indicates that this organelle is a promising target for drug intervention (Soeiro and de Castro, 2011).

The development of an efficient chemotherapeutic approach for Chagas' disease poses a critical challenge because the available drugs based on the nitro-derivatives – nifurtimox and benznidazole – are far from ideal. This is because they cause substantial secondary side effects, have limited efficacy against

* Corresponding author: Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. Fax: 00 55 21 2562 1432. E-mail: rubemb@ioc.fiocruz.br

† In Memoriam.

different parasite isolates, need to be used in long-term therapy, and show poor activity in the late chronic phase (Soeiro and de Castro, 2009; Urbina, 2010).

In the last decade, there has been a growing interest in the therapeutic use of natural products for the treatment of parasitic diseases (Coura and de Castro, 2002); in folk medicine, plants containing naphthoquinones are often used in the treatment of various diseases (Hazra *et al.* 2004). These bioactive quinones are present in plants belonging to several botanical families and structures are considered privileged in medicinal chemistry because of their biological activities and structural properties (Pinto and de Castro, 2009; Salas *et al.* 2011). The fundamental feature of quinones is the ease with which they are reduced, which allows them to act as oxidizing or dehydrogenating agents, and thus to generate ROS in a variety of cells, including *T. cruzi* (Docampo *et al.* 1978; Menna-Barreto *et al.* 2009a).

The biological activity of the naphthoquinone lapachol extracted from the heartwood of trees of the genus *Tabebuia* (Bignoniaceae) and its cyclization product, β -lapachone, have been intensively studied (Pinto *et al.* 2007). Our laboratory has been involved in the investigation of naphthoquinones and semi-synthetic derivatives, being the potential of naphthoimidazoles derived from the reaction of naphthoquinones with amino-compounds as trypanocidal agents as described (Pinto *et al.* 1997; Neves-Pinto *et al.* 2000; Moura *et al.* 2001, 2004).

In our other studies on the chemical reactivity of quinones, we focused on the search of naphthofuranquinoid compounds (Silva *et al.* 2006; Silva Jr. *et al.* 2008a,b), and found that the most active compound against the infective trypomastigote form of *T. cruzi* was the triazole derivative TN (2,2-dimethyl-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione) (Fig. 1). In the present work, we extended our investigation to the effect of TN activity on epimastigotes and amastigotes and the mechanism of action involved.

MATERIALS AND METHODS

Compound

TN (2,2-dimethyl-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione) was synthesized by the reaction between 3-azido-nor- β -lapachone and ethynylbenzene catalysed by Cu. The key intermediate, azidoquinone, was generated by nucleophilic substitution from 3-bromo- β -nor-lapachone with sodium azide in dichloromethane, as previously described (Silva Jr. *et al.* 2008b).

Parasite

All experiments were performed with the Y strain of *T. cruzi*. The epimastigote forms were maintained

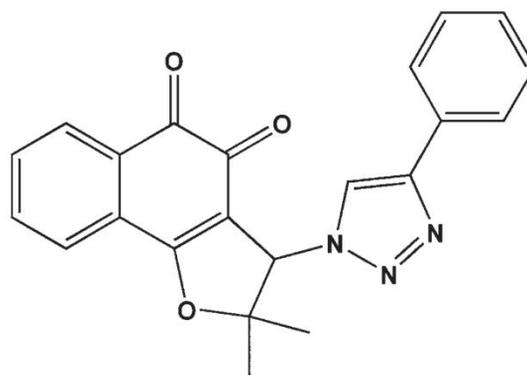


Fig. 1. Chemical structure of the triazolic naphthoquinone TN obtained from nor-lapachol.

axenically at 28 °C, with weekly transfers into liver infusion tryptose (LIT) medium and harvests during the exponential growth phase. Bloodstream trypomastigotes were obtained from infected albino Swiss mice at the peak of parasitaemia by differential centrifugation.

Direct effect of TN on *T. cruzi*

Bloodstream trypomastigotes were resuspended at a concentration of 10×10^6 cells/ml in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich Chemical Co.) containing 10% fetal calf serum (DMES). This suspension (100 μ l) was added to the same volume of TN, previously prepared at twice the desired final concentrations. The incubation was performed in 96-well microplates (Nunc Inc., Rochester, USA) at 4 °C for 24 h. The effect of TN on the proliferation of epimastigotes in LIT medium was monitored during 4 days at 28 °C using 24-well plates (Nunc Inc.). Cell counts were performed using the Neubauer chamber and the activity of the compounds was expressed as IC₅₀, corresponding to the concentration that leads to 50% parasite lysis (trypomastigotes) or proliferation inhibition (amastigotes and epimastigotes).

Effects of TN on intracellular amastigotes

Mice peritoneal macrophages were obtained from Swiss mice and were plated into 24-well plates (Nunc Inc.) at a density of 10^6 cells/well in DMES and maintained at 37 °C. After 1 day, the cultures were washed and infected with bloodstream trypomastigotes (10:1 parasites to host cells). After 3 h of interaction, the non-internalized parasites were removed by washing with PBS, and fresh DMES with or without TN was added to the cultures and changed every 2 days. At specific times, the percentage of infection and the number or parasites per 100 cells were quantified using a Zeiss Axioplan microscope (Oberkochen, Germany).

Toxicity to mammalian cells

Non-infected macrophages cultured on 96-well plates (Nunc Inc.) were treated with TN for 2 days, and the toxicity was evaluated by performing a dye-reduction assay (Mosmann, 1983). Briefly, the cells were incubated with 0.5 mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) for 4 h at 37 °C, after which DMSO was added to stop the reaction. The absorbance was read at 490 nm.

Transmission and scanning electron microscopy analysis

Epimastigotes (5×10^6 cells/ml) were treated with 3–9 μM TN for 24 h in LIT medium at 28 °C. They were then fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature (25 °C) for 40 min and post-fixed with a solution of 1% OsO₄, 0.8% potassium ferricyanide, and 2.5 mM CaCl₂ in the same buffer for 20 min at 25 °C. The cells were dehydrated in an ascending acetone series and embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate; these sections were examined under a Jeol JEM1011 transmission electron microscope (Tokyo, Japan). Alternatively, the parasites were dried by the critical-point method with CO₂, mounted on aluminum stubs, coated with a 20-nm-thick gold layer, and examined under a Jeol JSM6390LV scanning electron microscope.

Flow cytometry analysis

To assess the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), epimastigotes treated with 1.5–9.0 μM TN for 24 h were incubated with 50 nM tetramethylrhodamine (TMRE) (Molecular Probes, Carlsbad, USA) for 15 min. Alterations in TMRE fluorescence were quantified using an index of variation (IV) obtained by the equation $(\text{MT} - \text{MC})/\text{MC}$, where MT is the median of fluorescence for treated parasites, and MC, that of control parasites. Negative IV values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane. In the case of the negative control, 10 μM carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) (Sigma-Aldrich Chemical Co.) is added, which dissipates the $\Delta\Psi\text{m}$.

For cell cycle analysis, epimastigotes treated with 1.5–6.0 μM TN for 24 h were permeabilized with 0.1% saponin for 30 min followed by staining with 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (PI) for 15 min, as previously described (Menna-Barreto *et al.* 2007). For the evaluation of ROS production, the parasites treated with 3.0–9.0 μM TN for 24 h were labelled with 10 μM dihydroethidium (DHE) or 5 μM MitoSOX Red (Molecular Probes) for 30 min; parasites treated with 22 μM antimycin A (AA) (Sigma-Aldrich Chemical Co.) were used as positive control in all experiments. The material was kept on ice until

analysis. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) equipped with the Cell Quest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA). In total, 10 000 events were acquired in the region previously established as that of the parasites.

Fluorescence microscopy analysis

After treatment, the parasites were washed and incubated with 100 μM monodansyl cadaverine (MDC) (Sigma-Aldrich) for 1 h at 28 °C. After fixation in 4% paraformaldehyde (40 min/room temperature), the analysis was performed in a Zeiss AxioObserver M1 microscope (Oberkochen, Germany) to quantify the percentage of parasites that were MDC+.

Statistical analysis

The Mann-Whitney test was used to compare the control and treated groups. Differences with $P \leq 0.05$ were considered as statistically significant.

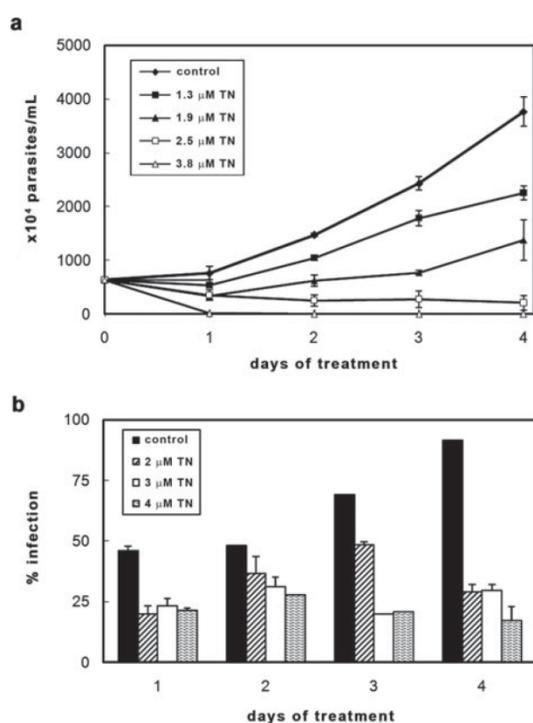
RESULTS

The treatment with TN was effective against blood-stream trypomastigotes, epimastigotes, and intracellular amastigotes, with IC₅₀/1 day in the range of 3–25 μM (Table 1). For trypomastigotes, IC₅₀/24 h was $23.3 \pm 2.8 \mu\text{M}$ in the absence of blood. The proliferative forms of *T. cruzi* were more susceptible to TN, having IC₅₀/24 h values of $5.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ and $7.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$ for amastigotes and epimastigotes, respectively (Table 1 and Fig. 2a,b). A dose-dependent inhibitory effect on epimastigotes (Fig. 2a) and a marked decrease of 81% in the number of infected peritoneal macrophages after 4 days of treatment (Fig. 2b) were observed. MTT experiments showed no damage to the host cells treated with 2 times the highest concentration of TN used in assays with infected cells (data not shown).

The ultrastructural effects of TN on epimastigotes after 24 h were analysed at concentrations below the IC₅₀ value (Table 1). Transmission electron microscopy analysis revealed that untreated parasites showed normal ultrastructural morphology of organelles such as the mitochondrion, nucleus, kinetoplasts, and reservosomes (Fig. 3). The treatment of epimastigotes with 3 and 6 μM TN (Figs 4 and 5) led to the appearance of well-developed endoplasmic reticulum profiles surrounding different subcellular structures, especially reservosomes. This finding suggests close contact between the membranes of both structures and also an intense disorganization in the reservosome morphology, including membrane disruption. Blebbing of the flagellar membrane, strong disorganization in the Golgi complex

Table 1. IC₅₀ values expressed in μM for the effect of TN on different forms of *Trypanosoma cruzi*

Day ¹	Trypomastigotes		Epimastigotes	Amastigotes
	0% blood	5% blood		
1	23.3 ± 2.8 ²	17.3 ± 2.0 ³	7.6 ± 0.6	5.2 ± 1.1 ⁴
2	—	—	5.3 ± 1.5	2.3 ± 0.4
3	—	—	5.4 ± 1.6	1.4 ± 0.3
4	—	—	4.7 ± 2.4	2.9 ± 0.8

¹ Days of treatment.² Mean ± standard deviation of at least 3 independent experiments.³ (Silva Jr. *et al.* 2008a).⁴ Based on number of parasites per 100 macrophages.Fig. 2. Effect of TN on the proliferation of *Trypanosoma cruzi*. (a) Epimastigotes; (b) intracellular amastigotes. The graphs show the mean and standard variation in 1 of 3 independent experiments, performed in duplicate.

cisternae, and the presence of cytosolic concentric membrane structures were other frequent alterations induced by TN. Fluorescence microscopy revealed an increase of MDC-labelling in treated epimastigotes up to 30% MDC+ parasites (Fig. 6). Further, the mitochondria of treated parasites did not appear to be damaged (Figs 4 and 5). Treatment with a high concentration of 9 μM TN led to severe morphological alterations in the protozoa, indicating the lysis of parasites (data not shown). Examination using scanning electron microscopy showed the typical elongated body morphology (Fig. 7a,b). TN (3 and 6 μM) induced remarkable alterations in

epimastigotes characterized by the appearance of bizarre multiflagellar forms and abnormal morphology during parasite division (Fig. 7c–g). A semi-quantitative analysis was also performed, whereby approximately 80% of treated parasites were found to have aberrant morphology and around 40% presented bizarre multiple flagella (data not shown).

The $\Delta\Psi\text{m}$ was assessed by TMRE labelling monitored by flow cytometry. TN at concentrations ranging from 1.5 to 6 μM induced no variation in fluorescence intensity, while at a concentration of 9 μM , it produced a 28% decrease in the $\Delta\Psi\text{m}$ compared to the $\Delta\Psi\text{m}$ in control parasites. The percentage of epimastigotes labelled by this probe was similar in untreated and treated parasites (Table 2). Incubation of the cells with 10 μM FCCP dissipated the $\Delta\Psi\text{m}$ and consequently decreased the extent of TMRE labelling. TN-treated epimastigotes were also labelled with PI for the evaluation of the cell cycle. This treatment led to a significant decrease in the percentage of parasites with duplicated DNA (Fig. 8), corresponding to an inhibition in the range of 27–52%. Further, at a concentration of 6 μM , TN induced a 10% increase in the percentage of interphasic DNA. The percentage of epimastigotes with fragmented DNA was similar to that of control and treated parasites. ROS production was also measured by DHE or Mitosox Red labelling (Fig. 9). TN in the concentration range 3 to 9 μM led to an increase in the percentage of DHE-positive and Mitosox Red-positive epimastigotes, reaching 23.1% (Fig. 9a) and 3.2% (Fig. 9b), respectively. The positive control with AA led to a strong increase in the labelling of both markers.

DISCUSSION

Drugs (agents) containing a triazole nucleus or a cyclic dienone moiety have been reported to display a variety of independent biological activities, such as microbicidal, anti-viral, anti-cancer and anti-inflammatory (Holla *et al.* 2005; Ferreira *et al.* 2007; Abdel-Rahman *et al.* 2009). The design of triazolic naphthofuranquinones (Silva Jr. *et al.* 2008a) was



Fig. 3. Transmission electron microscopy analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Untreated parasites present typical morphology of the mitochondrion (M), nucleus (N), kinetoplast (K), and reservosomes (R). Scale bar = 1 μm .

based on a molecular hybridization approach (Viegas-Jr. *et al.* 2007). In order to enhance the pharmacological activity of the naphthoquinoid compound, nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole was prepared by the insertion of the pharmacophoric group 1,2,3-triazole phenyl substituted in the C-ring of the quinone (Silva Jr. *et al.* 2008b). Previous studies with *T. cruzi* trypomastigotes indicated that TN was the most active 1,2,3-triazolic naphthofuranquinone among a series of nor- β -lapachone derivatives, and such behaviour was attributed to its higher lipophilic character (Silva Jr. *et al.* 2008a). On comparing a high number of naphthoquinones, we observed that the presence of an aliphatic side chain leads to higher activity, possibly associated with an increase in lipophilicity and, consequently, better penetration of the compound through the plasma membrane of the parasite (Moura *et al.* 2001).

Because of high TN activity against trypomastigote forms (IC₅₀/24 h of 17.3 \pm 2.0 μM at 4 °C and in the presence of 5% mouse blood) (Silva Jr. *et al.* 2008a), this triazolic naphthofuranquinone was selected for further analysis. In the absence of blood (only in the culture medium), the IC₅₀/24 h value was 23.3 \pm 2.8 μM , suggesting a clear reduction in the trypanocidal effect induced by blood addition. Such a reduction has already been reported for β -lapachone and other naphthoquinones, and can be explained by the interaction of naphthoquinones with serum

proteins, which reduces the amount of free compounds (Lopes *et al.* 1978). TN showed higher activity against the proliferative forms of *T. cruzi*, with IC₅₀/24 h values at 7.6 \pm 0.6 μM and 5.2 \pm 1.1 μM in epimastigotes and amastigotes, respectively. The most susceptible form of the parasite was the intracellular amastigote which indicates that the trypanocidal effect of naphthoquinone could be potentialized by the microbicidal properties of macrophages.

In order to identify potential targets of TN in *T. cruzi*, electron microscopy and flow cytometry analysis of treated epimastigotes were performed. Interestingly, there was no morphological damage in the mitochondrion or loss of $\Delta\Psi\text{m}$ after treatment with 3 and 6 μM TN – concentrations below the IC₅₀ value. Previous studies have reported this organelle to be the main target of β -lapachone and naphthoimidazole derivatives of this quinone and also of naphthofuranquinones derived from C-allyl lawsone (Docampo *et al.* 1978; Menna-Barreto *et al.* 2005, 2007, 2009a). The presence of the triazolic moiety led to an alteration in structural configuration and ROS production, thus reducing the availability of TN inside the mitochondrion and consequently leading to damage in other structures in the parasite. The treatment with TN also led to reservosome disruption, strong disorganization in Golgi cisternae, and the development of membrane blebs in the flagellum.

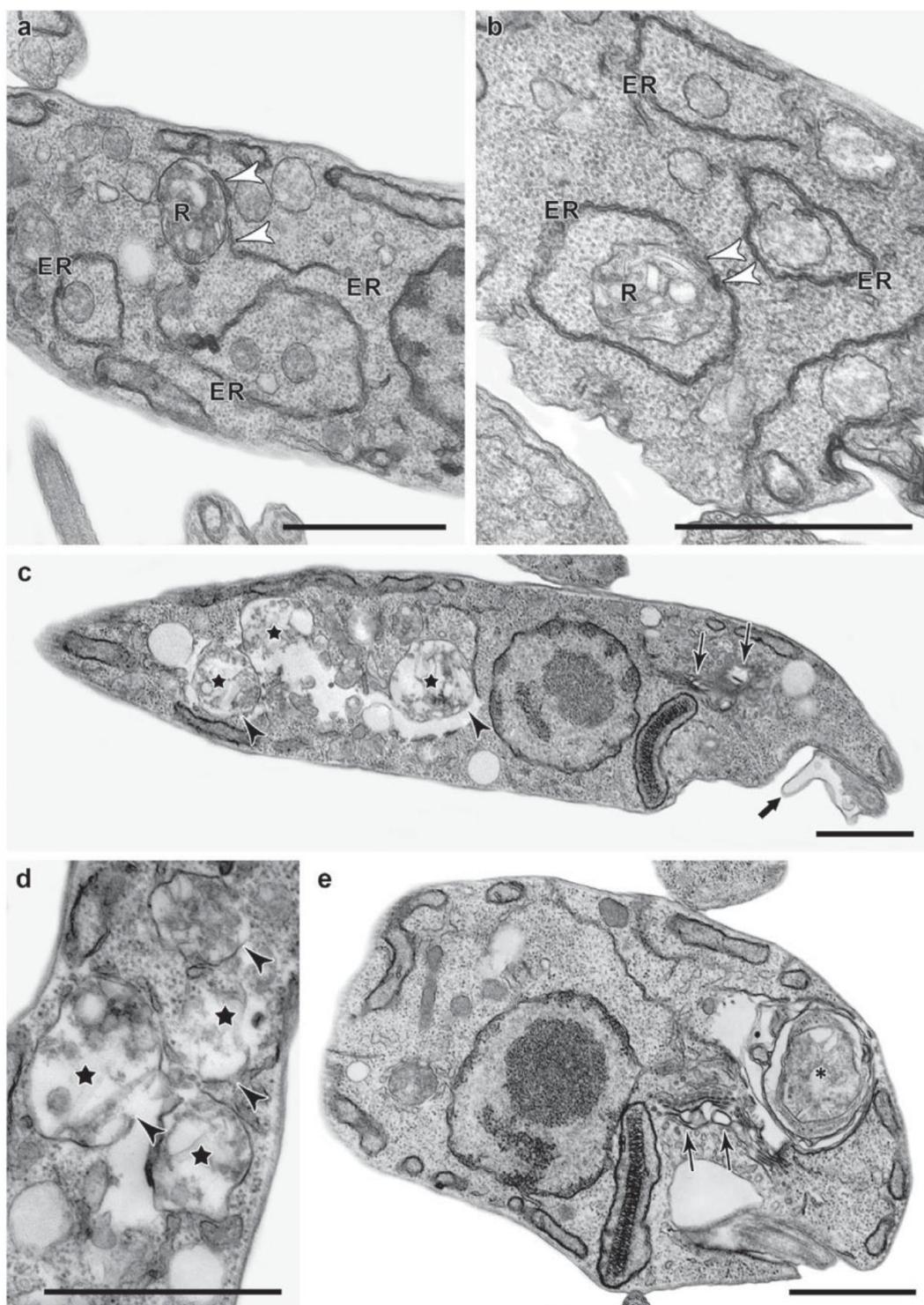


Fig. 4. Transmission electron microscopy analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes treated with $3 \mu\text{M}$ TN. (a,b) Parasites showing well-developed endoplasmic reticulum (ER) profiles surrounding the reservosomes (R) (white arrowheads). The treatment also caused (c–e) intensive disorganization in the reservosome (R) morphology (black star) with loss of membrane integrity (black arrowheads), blebs in the flagellar membrane (black thick arrow), severe Golgi complex disruption (black arrows), and the formation of concentric membrane structures in the cytosol (asterisk). Scale bars = $1 \mu\text{m}$.

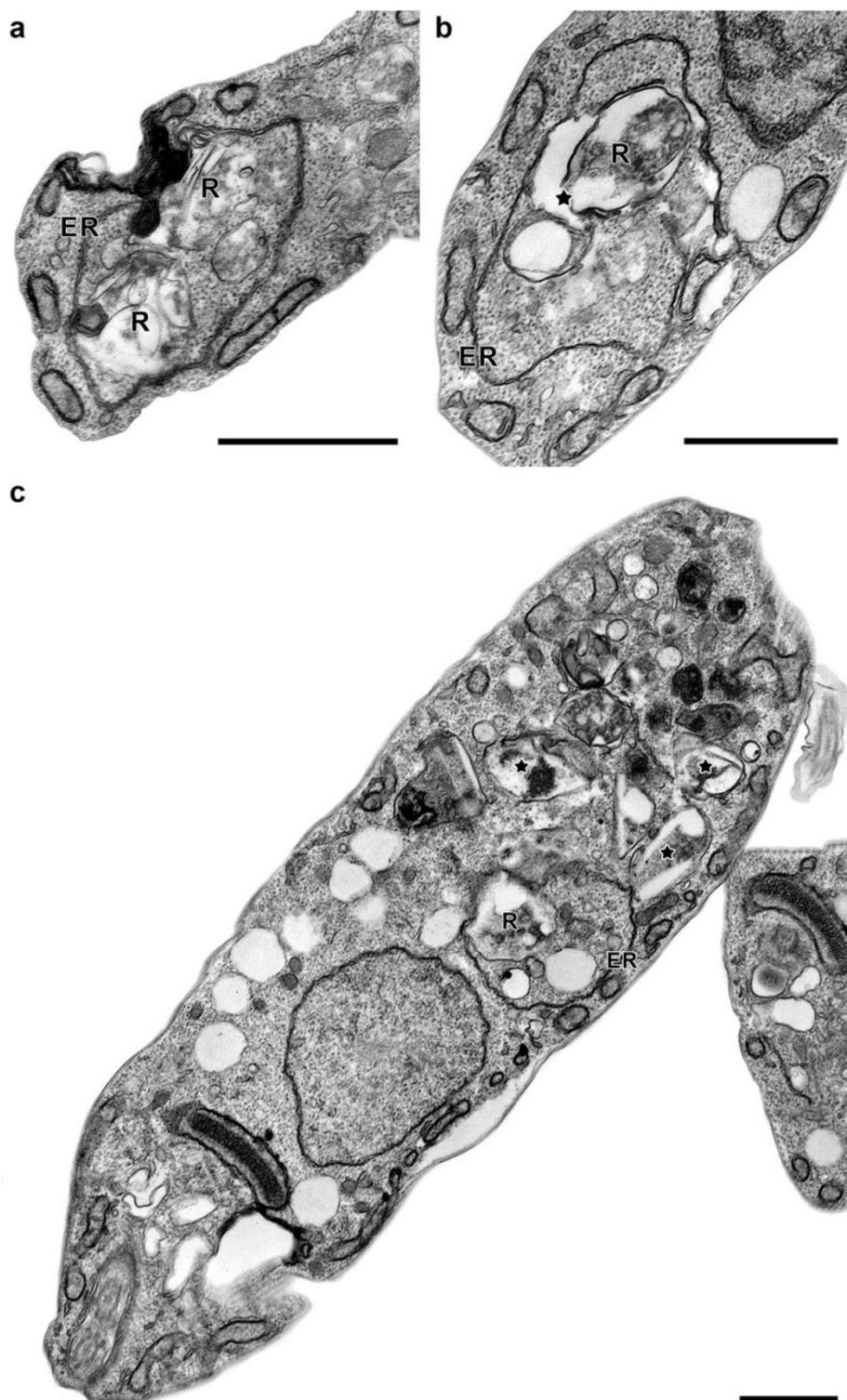


Fig. 5. Transmission electron microscopy analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes treated with $6\ \mu\text{M}$ TN. (a–c) This dose of the naphthoquinone also led to the appearance of well-developed endoplasmic reticulum (ER) profiles surrounding the reservosomes (R), as well as a severe disruption of this organelle (black star). Scale bars = $1\ \mu\text{m}$.

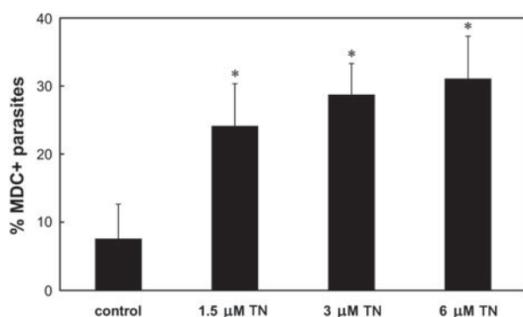


Fig. 6. Fluorescence microscopy analysis of MDC labelling in TN-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. The treatment with TN induced an increase in the number of parasites containing autophagic vacuoles. The graphs show the mean and standard variation of 3 independent experiments. Asterisks represent the significant difference in relation to the control ($P \leq 0.009$).

The most common phenotype observed in TN-treated epimastigotes was autophagy as demonstrated by the well-developed endoplasmic reticulum profiles surrounding reservosomes, close contact between the membranes of 2 organelles, and the presence of cytosolic concentric membrane structures. Autophagy involving the autophagosomal-lysosomal system is crucial for maintaining the metabolic balance by the recycling of cellular structures; however, its deregulation leads to death (Reggiori and Klionsky, 2002). In *T. cruzi*, 2 ubiquitin-like conjugation systems were present, being the orthologues of the ATG8-ATG7-ATG3 system previously detected in *T. cruzi* (Brennan *et al.* 2011; Duszenko *et al.* 2011).

Brennan and colleagues (2011) also suggested that differences in catabolic and biosynthetic capacities of the trypanosomatids occurred between life-cycle stages, leading to the morphological changes and metabolic adaptations. Such events depend on the increase in turnover of structural and enzymatic constituents of the parasites (Duszenko *et al.* 2011). In *T. brucei*, ultrastructural studies pointed to the involvement of autophagy during differentiation of the parasites (Vickerman and Tetley, 1977). The importance of the autophagic process during differentiation was suggested in *Leishmania* species (Waller and McConville, 2002) and *T. cruzi*, as demonstrated by the participation of reservosomes (Sant'anna *et al.* 2008). The strong alterations observed in these organelles suggested the autophagic process as a part of the TN mechanism of action in epimastigotes. Several classes of drugs have been shown to induce autophagy in trypanosomatids, in particular naphthoquinones and derivatives in *T. cruzi*, in which an increase in the number of ATG transcripts and specific inhibition of the process were detected (Menna-Barreto *et al.* 2009b,c; Duszenko *et al.* 2011). Anti-microbial peptides and rapamycin induced

autophagy in *L. donovani* and *T. brucei* (Bera *et al.* 2003; Denninger *et al.* 2008), respectively, showing an increase in the number of autophagic vacuoles (MDC labelled) and the appearance of typical morphological characteristics, such as those observed after treatment with TN. The increase in the MDC fluorescence in treated epimastigotes also suggests the participation of autophagy in the TN mechanism of action. Our ultrastructural data suggested that the endoplasmic reticulum provided membrane for the formation of the pre-autophagosomal structure, as previously reported (Klionsky *et al.* 2003).

Scanning electron microscopy demonstrated that TN induced the appearance of multiflagellar epimastigotes; this suggests the blockage of mitosis by TN, which has already been described for epimastigotes after treatment with agents that affect the cytoskeleton (Jordan and Wilson, 1999; Menna-Barreto *et al.* 2009b). To confirm this hypothesis, flow cytometry assays of the cell cycle were performed in parasites after treatment with the same TN concentrations used in the ultrastructural analysis. TN induced a significant reduction in the percentage of epimastigotes with duplicated DNA; this indicates that the event triggered by this naphthoquinone occurs before the duplication of genetic material, and hence before the impairment of cytokinesis. In *T. brucei*, the compound dihydroxyacetone also led to cell cycle arrestment and to the appearance of morphological autophagic features (Uzcátegui *et al.* 2007). Indeed, further experiments must be performed in order to evaluate the cross-link between these two effects of TN.

The *T. cruzi* mitochondrion is an organelle implicated in both ATP synthesis and redox homeostasis, since it is the main source of ROS in the parasite. In trypanosomatids, the lack of detoxification of ROS and reactive nitrogen species makes this organelle an extraordinary drug target (Soeiro and de Castro, 2009). It is well established that the mechanism of action of naphthoquinones involves ROS generation in different models, including *T. cruzi* (Docampo *et al.* 1978; Menna-Barreto *et al.* 2009a). We evaluated ROS production in epimastigotes after treatment with TN by flow cytometry using the following 2 fluorescent probes: DHE, which is commonly employed in cardiovascular research for intracellular detection of ROS, (Dikalov *et al.* 2007) and MitoSox Red, a specific marker of mitochondrial ROS, widely used to measure ROS production inside this organelle after oxidative stress stimuli (Robinson *et al.* 2008). TN treatment induced a clear increase in the number of cells generating ROS, as shown by the results of flow cytometry performed using both probes. The ultrastructural analysis pointed to cytosolic but not mitochondrial damage, thus supporting the flow cytometry data. Previously, it was shown that both naphthopyran and naphthofuranquinones induced

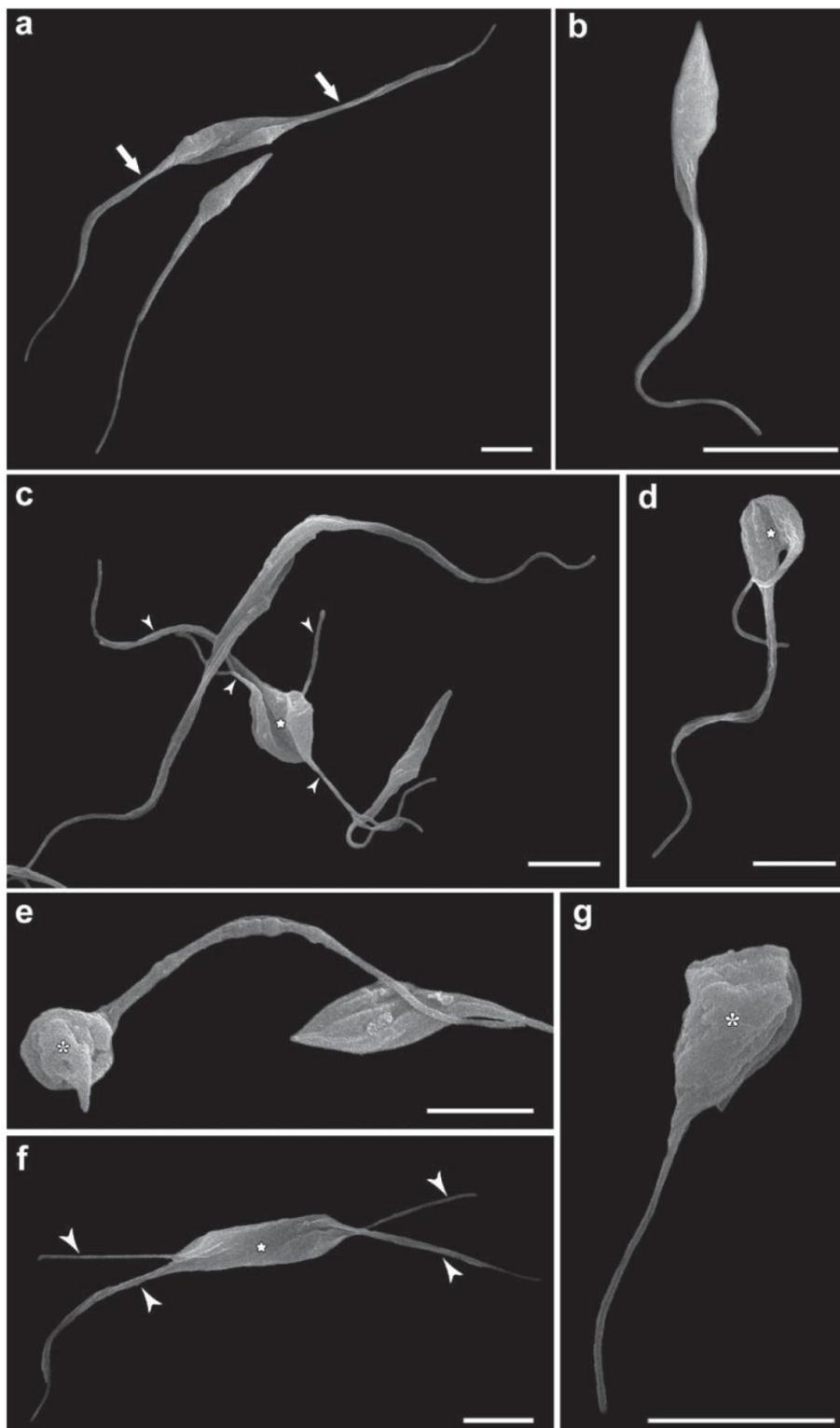


Fig. 7. Scanning electron microscopy analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes treated with TN. (a,b) Control parasites presenting typical body morphology during mitosis (thick arrows). Treatment with (c–e) 3 μM and (f,g) 6 μM TN led to the appearance of bizarre epimastigotes with multiple flagella (arrowheads), abnormal parasite morphology during cytokinesis (stars), and strong alterations in shape (asterisks). Scale bars = 5 μm .

Table 2. Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by TMRE labelling

	%TMRE + parasites	Median	IV ¹
Control	98.1 ± 0.5 ²	22.5 ± 3.4	0.00
Control + 10 µM FCCP	2.2 ± 2.6	3.4 ± 1.2*	-0.85
1.5 µM TN	98.8 ± 0.3	25.7 ± 5.6	0.14
3.0 µM TN	98.5 ± 0.8	23.6 ± 1.8	0.07
6.0 µM TN	97.6 ± 1.6	21.6 ± 1.1	-0.03
9.0 µM TN	96.4 ± 1.8	16.3 ± 3.3*	-0.28

¹ IV = (MT - MC)/MC, where MT corresponds to the median fluorescence for treated parasites, and MC corresponds to that of control parasites.

² Mean ± standard deviation of 3 independent experiments. Asterisks indicate significant differences in relation to the control group ($P \leq 0.01$).

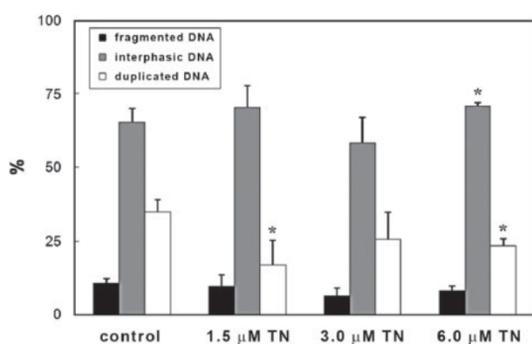


Fig. 8. Flow cytometry analysis of the cell cycle in TN-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. The saponin-permeabilized parasites were labelled with PI for evaluation. Treatment with the quinone led to a decrease in the percentage of duplicated DNA epimastigotes. The graphs show the mean and standard variation of 3 independent experiments. Asterisks represent the significant difference in relation to the control ($P \leq 0.05$).

ROS production in *T. cruzi* and caused extensive morphological damage in the mitochondrion (Docampo *et al.* 1978; Menna-Barreto *et al.* 2009a). Interestingly, TN led to an increase in ROS levels through a mitochondrion-independent pathway, evidenced by the lack of morphological and $\Delta\Psi_m$ alterations in this organelle after the treatment. Despite the high amounts of trypanothione in epimastigotes (Irigoin *et al.* 2008), the oxidative stress triggered by TN probably plays a role in the trypanocidal activity of this compound and must be further investigated.

Our data exclude the possibility of the mitochondrion being a TN target; this triazolic naphthofuranquinone displays a mechanism of action different from those of other studied naphthoquinones. The trypanocidal action of TN involves

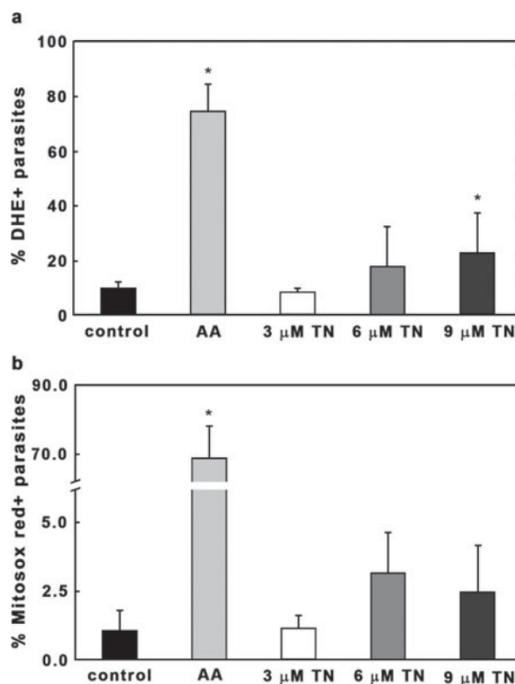


Fig. 9. Flow cytometry analysis of ROS production in TN-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. ROS measurement was performed by (a) DHE and (b) Mitosox Red labelling. Treatment with TN induced an increase in the number of parasites producing ROS. As a positive control, 22 µM AA was used. The graphs show the mean and standard variation in 1 of 3 independent experiments. Asterisks represent the significant difference in relation to the control ($P \leq 0.05$).

autophagy, especially of reservosomes, mitosis blockage, and ROS generation that culminates in parasite death. Finally, hybrid molecules obtained from quinones and triazoles lead to an increase in the redox properties of quinones and represent an excellent starting point for the development of new candidates for a chemotherapeutic approach for treating Chagas' disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Marcus Oliveira for his critical reading of this work and Mr Marcos Meuser for his excellent technical work.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants from CNPq, FAPERJ (PRONEX E-26/110.574/2010), and FIOCRUZ.

REFERENCES

Abdel-Rahman, A. A. and Wada, T. (2009). Synthesis and antiviral evaluation of 5-(1,2,3-triazol-1-ylmethyl)uridine derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C* **64**, 163–166.

- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R. and Vaidya, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and Biochemical Parasitology* **127**, 23–35.
- Brennan, A., Gualdrón-López, M., Coppens, I., Rigden, D. J., Ginger, M. L. and Michels, P. A. (2011). Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Molecular and Biochemical Parasitology* **177**, 83–89.
- Coura, J. R. and de Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 3–24.
- Denninger, V., Koopmann, R., Muhammad, K., Barth, T., Bassarak, B., Schönfeld, C., Kilungu, B. K. and Duszenko, M. (2008). Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? *Methods in Enzymology* **451**, 373–408.
- Dikalov, S., Griending, K. K. and Harrison, D. G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**, 717–727.
- Docampo, R., De Souza, W., Cruz, F. S., Roitman, I., Cover, B. and Gutteridge, W. E. (1978). Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **57**, 189–198.
- Duszenko, M., Ginger, M. L., Brennan, A., Gualdrón-López, M., Colombo, M. I., Coombs, G. H., Coppens, I., Jayabalasingham, B., Langsley, G., de Castro, S. L., Menna-Barreto, R., Mottram, J. C., Navarro, M., Rigden, D. J., Romano, P. S., Stoka, V., Turk, B. and Michels, P. A. (2011). Autophagy in protists. *Autophagy* **7**, 127–158.
- Ferreira, S. B., Costa, M. S., Boechat, N., Bezerra, R. J., Genestra, M. S., Canto-Cavaleiro, M. M., Kover, W. B. and Ferreira, V. F. (2007). Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 1388–1395.
- Hazra, B., das Sarma, M. and Sanyal, U. (2004). Separation methods of quinonoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines. *Journal of Chromatography B* **812**, 259–275.
- Holla, B. S., Mahalinga, M., Karthikeyan, M. S., Poojary, B., Akberali, P. M. and Kumari, N. S. (2005). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some substituted 1,2,3-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 1173–1178.
- Irigoin, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohe, L. and Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 733–742.
- Jordan, M. A. and Wilson, L. (1999). The use and action of drugs in analysing mitosis. *Methods in Cell Biology* **61**, 267–295.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* **5**, 539–545.
- Lopes, J. N., Cruz, F. S., Docampo, R., Vasconcellos, M. E., Sampaio, M. C., Pinto, A. V. and Gilbert, B. (1978). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **72**, 523–531.
- Menna-Barreto, R. F., Henriques-Pons, A., Pinto, A. V., Morgado-Diaz, J. A., Soares, M. J. and de Castro, S. L. (2005). Effect of a beta-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 1034–1041.
- Menna-Barreto, R. F., Corrêa, J. R., Cascabulho, C. M., Fernandes, M. C., Pinto, A. V., Soares, M. J. and de Castro, S. L. N. (2009c). Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **136**, 499–510.
- Menna-Barreto, R. F. S., Corrêa, J. R., Pinto, A. V., Soares, M. J. and de Castro, S. L. (2007). Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. *Parasitology Research* **101**, 895–905.
- Menna-Barreto, R. F. S., Gonçalves, R. L., Costa, E. M., Silva, R. S., Pinto, A. V., Oliveira, M. F. and de Castro, S. L. (2009a). The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radicals and Biology Medicine* **47**, 644–653.
- Menna-Barreto, R. F., Salomão, K., Dantas, A. P., Santa-Rita, R. M., Soares, M. J., Barbosa, H. S. and de Castro, S. L. (2009b). Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* **40**, 157–168.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63.
- Moura, K. C. G., Emery, F. S., Neves-Pinto, C., Pinto, M. C. F. R., Dantas, A. P., Salomão, K., de Castro, S. L. and Pinto, A. V. (2001). Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**, 325–338.
- Moura, K. C. G., Salomão, K., Menna-Barreto, R. F. S., Emery, F. S., Pinto, M. C. F. R., Pinto, A. V. and de Castro, S. L. (2004). Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazoles from beta-lapachone. *European Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 639–645.
- Neves-Pinto, C., Dantas, A. P., De Moura, K. C., Emery, F. S., Polequevitch, P. F., Pinto, M. C. F. R., de Castro, S. L. and Pinto, A. V. (2000). Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneimittel-Forschung* **50**, 1120–1128.
- Pinto, A. V. and de Castro, S. L. (2009). The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules* **14**, 4570–4590.
- Pinto, A. V., Menna-Barreto, R. F. S. and de Castro, S. L. (2007). Naphthoquinones isolated from *Tabebuia*: a review about the synthesis of heterocyclic derivatives, screening against *Trypanosoma cruzi* and correlation structure-trypanocidal activity. In *Phytomedicines. Vol. 16*. (ed. Govil, J. N.), pp. 112–127. Studium Press, Houston, Texas, USA.
- Pinto, A. V., Pinto, C. N., Pinto, M. C., Rita, R. S., Pezzella, C. A. and de Castro, S. L. (1997). Trypanocidal activity of synthetic heterocyclic derivatives of active quinines from *Tabebuia* sp. *Arzneimittel-Forschung* **47**, 74–79.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388–1402.
- Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic Cell* **1**, 11–21.
- Robinson, K. M., Janes, M. S. and Beckman, J. S. (2008). The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature Protocols* **3**, 941–947.
- Salas, C. O., Faúndez, M., Morello, A., Maya, J. D. and Tapia, R. A. (2011). Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for chagas' disease. *Current Medicinal Chemistry* **18**, 144–161.
- Sant'Anna, C., Parussini, F., Lourenço, D., de Souza, W., Cazzulo, J. J. and Cunha-e-Silva, N. L. (2008). All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. *Histochemistry and Cell Biology* **130**, 1187–1198.
- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas' disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 75–85.
- Silva, E. N., Jr., Menna-Barreto, R. F. S., Pinto, M. C. F. R., Silva, R. S. F., Teixeira, D. V., Souza, M. C. B. V., de Simone, C. A., de Castro, S. L., Ferreira, V. F. and Pinto, A. V. (2008a). Naphthoquinoid [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 1774–1780.
- Silva, E. N., Jr., Souza, M. C. B. V., Fernandes, M. C., Menna-Barreto, R. F. S., Pinto, M. C. F. R., Lopes, F. A., Simone, C. A., Andrade, C. K., Pinto, A. V., Ferreira, V. F. and de Castro, S. L. (2008b). Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**, 5030–5038.
- Silva, R. S. F., Costa, E. M., Trindade, U. L. T., Teixeira, D. V., Pinto, M. C. F. R., Santos, G. L., Malta, V. R. S., de Simone, C. A., Pinto, A. V. and de Castro, S. L. (2006). Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**, 526–530.
- Soeiro, M. N. C. and de Castro, S. L. (2011). Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. *Open Medicinal Chemistry Journal* **5**, 21–30.
- Soeiro, M. N. C. and de Castro, S. L. (2009). *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **13**, 105–121.
- Urbina, J. A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* **115**, 55–68.
- Uzcátegui, N. L., Denninger, V., Merkel, P., Schoenfeld, C., Figarella, K. and Duszenko, M. (2007). Dihydroxyacetone induced autophagy in African trypanosomes. *Autophagy* **3**, 626–629.
- Vaidian, A. K., Weiss, L. M. and Tanowitz, H. B. (2004). Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid Biology Disease* **13**, 2.
- Vickerman, K. and Tetley, L. (1977). Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Annals of Belgian Society of Tropical Medicine* **57**, 441–457.
- Viegas-Jr, C., Danuello, A., Bolzani, V. S., Barreiro, E. J. and Fraga, C. A. M. (2007). Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 1829–1852.
- Waller, R. F. and McConville, M. J. (2002). Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology* **32**, 1435–1445.