



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

FIOCRUZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* IN VITRO E IN VIVO DE
DERIVADOS DE VITAMINA K**

MURILO FAGUNDES DE CASTRO

Salvador – Brasil

2012

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

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* IN VITRO E IN VIVO DE
DERIVADOS DE VITAMINA K**

MURILO FAGUNDES DE CASTRO

Orientadoras: Prof^a Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Prof^a Dra. Simone Garcia Macambira

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa do CPqGM
como pré-requisito para obtenção
do grau de Mestre.

Salvador – Brasil

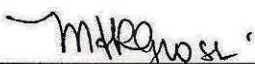
2012

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-Trypanosoma cruzi “*in vitro*” E “*in vivo*” DE DERIVADOS DE VITAMINA K”

MURILO FAGUNDES DE CASTRO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA . . .



Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ



Dr^a Patricia Sampaio Tavares Veras
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a realização deste trabalho a DEUS, Senhor onipotente, mentor intelectual de toda existência. Agradeço aos meus pais, exemplos de amor e eternos amigos de todas as horas; aos familiares pela compreensão e palavras de apoio; a todos meus amigos que já cruzaram suas vidas em minha história, deixando em cada passo, uma célula de esperança; a Alcione, Minha Cy, que mesmo na distância dos ares, comunga ao meu lado a realização de um ideal; aos colegas do mestrado; aos amigos do grupo de cardio do CBTC: Alberto Neto, Pâmela, Paula; aos colegas Gisele, Marcos, Cristina, equipe do biotério: Renato, Fagner; Edlúcia, Rose e a toda a equipe do laboratório CBTC; a todos os colegas do laboratório LETI, ao grupo de Chagas do LETI – Tanira Matutino, Dra. Elisalva Guimarães, em especial ao amigo Cássio Meira, pelo grande apoio. Agradeço as agências de fomento que deram suporte a este projeto: FAPESB, CNPq, RENORBIO. Agradeço enormemente às minhas orientadoras: Dra. Simone Garcia Macambira e Dra. Milena Botelho Pereira Soares, que mesmo nas horas de desânimo, acreditaram em minha capacidade e potencial para superar esta importante etapa. Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

“Não há mal no mundo que não possa ser superado, por maior que sejam as dificuldades...”.

“Disse-lhes Jesus: ‘Se podes alguma coisa!... Tudo é possível ao que crê’.

Marcos 9, 23.

CASTRO, Murilo Fagundes de. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* de derivados de vitamina K. 72f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador-BA, Brasil, 2012.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é considerada um agravo ainda negligenciado. Atualmente, estima-se cerca de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, em todo o mundo, principalmente na América Latina. Sabe-se que alguns derivados de naftoquinonas podem agir sobre a tripanotiona redutase (TR), enzima específica dos tripanossomatídeos responsável pelo controle oxidativo celular. A inibição da TR favorece um processo oxidativo e morte do protozoário. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial anti-*T. cruzi* da fitomenadiona, (K1) e menadiona (K3), ambas vitaminas K derivadas de naftoquinonas. Com este propósito, o efeito tripanocida de K1 e K3 foi avaliado através de ensaios *in vitro* com as formas tripomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi* nas cepas Colombiana e Y utilizando os testes de inibição, citotoxicidade dos compostos, ensaio de infecção em macrófagos, avaliação de alterações ultraestruturais, bem como ensaio em *in vivo* para avaliação na redução da parasitemia. Os valores de IC₅₀ mais significativos para formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram 27,55 µM para K1, 2,19 µM para K3 e 12,46 µM para o benzonidazol, a droga padrão. Contudo, o tratamento com a vitamina K1 não reduziu a parasitemia *in vivo*, que permaneceu alta assim como a do controle tratado com veículo. A vitamina K3 foi capaz de inibir ambas as cepas e diferentes formas do parasito em ensaios *in vitro*. No ensaio de infecção de macrófagos, a vitamina K3 em concentração de 21,4 µM inibiu de forma mais significativa a infecção de células em relação à droga padrão, em concentração de 38,4 µM. Apesar da citotoxicidade mais elevada, esta droga apresentou uma seletividade maior ao parasito do que a células de mamíferos e, em baixas doses, causou a redução na parasitemia *in vivo*. As avaliações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram alterações celulares induzidas por estes compostos, destacando-se a tumefação do cinetoplasto e a presença de vacúolos. A quantificação ultraestrutural na avaliação por microscopia eletrônica de varredura demonstrou alterações em cerca de 80% dos parasitos observados quando tratados com K3 a 5 µM. Nossos resultados demonstram o efeito anti-*T. cruzi* das moléculas testadas e sugerem que estas possam servir de base para o desenho de novos compostos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *T. cruzi*, tripanocida, naftoquinona, vitamina K.

CASTRO, Murilo Fagundes de. In vitro and in vivo evaluation of the anti-*Trypanosoma cruzi* of Vitamin K Derivatives. 72f. il. Thesis (Master) – Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Institute, Salvador-BA, Brazil, 2012.

ABSTRACT

Chagas disease (AD) is considered a neglected disease. Currently, it is estimated 10 million people infected with *Trypanosoma cruzi*, worldwide, mostly in Latin America. It is known that some derivatives of naphthoquinones can act on the trypanothione reductase (TR), specific enzyme of trypanosomatids responsible for controlling oxidative stress. Inhibition of TR favors an oxidative process and death of the parasite. This work aimed to investigate the potential anti-*T. cruzi* of phytomenadione, (K1) and menadione (K3), both vitamin K derived from naphthoquinones. For this purpose, the trypanocidal effect of K1 and K3 was evaluated by in vitro assays with epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* in strains Colombian and Y using the inhibition tests, cytotoxicity of compounds of infection in macrophages test, evaluation of ultrastructural alterations as well as in vivo test to evaluate the reduction of the parasitemia. The best IC₅₀ values to trypomastigote forms of *T. cruzi* were 27.55 µM to K1 and 2.19 µM to K3, compared to 12.46 µM of benznidazole, the standard drug. However, the treatment with vitamin K1 did not reduce parasitemia in vivo, which remains high similar to the vehicle-treated control group. Vitamin K3 was able to inhibit both strains and different forms of the parasite in in vitro assays. In macrophage infection assay, vitamin K3 at a concentration of 21.4 µM significantly inhibited *T. cruzi* infection of cells when compared to the standard drug (benznidazole) in a concentration of 38.4 µM. Although this compound had a high cytotoxicity, vitamin K3 showed greater selectivity than the parasite mammalian cells, and in a low dose caused a reduction in parasitemia in vivo. The ultrastructural evaluation by transmission electron microscopy revealed cellular alterations induced by these compounds, especially the swelling of the kinetoplast and the presence of vacuoles. The ultrastructural quantification in the evaluation by scanning electron microscopy showed changes in about 80% of parasites observed when treated with 5 µM K3. Our results demonstrate the anti-*T. cruzi* molecules tested, suggesting that they may serve as a basis for designing new drug candidate compounds for the treatment of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease, *T. cruzi*, trypanocidal, naphthoquinone, vitamin K.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Número de casos da doença de Chagas na fase aguda, por regiões do Brasil no período de 2000 a 2010.....	14
Figura 2	Ciclo de vida clássico do <i>Trypanosoma cruzi</i> através do vetor triatomíneo.....	21
Figura 3	Estrutura da Tripanotiona.....	24
Figura 4	Cascata de mecanismos enzimáticos que ocasionam a neutralização de radicais livres através da Tripanotiona Redutase.....	24
Figura 5	Ciclo Redox proposto da Vitamina K.....	26
Figura 6	Estrutura molecular plana e tridimensional da K1.....	28
Figura 7	Estrutura molecular plana e tridimensional da K3.....	29
Figura 8	Percentual de macrófagos infectados e tratados com K1 em diferentes concentrações.....	41
Figura 9	Número de amastigotas/100 células tratadas com K1 em diferentes concentrações.....	42
Figura 10	Percentual de macrófagos infectados e tratados com K3 em diferentes concentrações.....	43
Figura 11	Número de amastigotas/100 células tratadas com K3 em diferentes concentrações.....	44
Figura 12	Microscopia óptica de macrófagos infectados e tratados com K1 e K3.....	45
Figura 13	Quantificação das alterações ultraestruturais após tratamento <i>T. cruzi</i> - cepa Colombiana com K1 e K3 por MEV.....	46
Figura 14	Alterações ultraestruturais observadas em MEV.....	47
Figura 15	Alterações ultraestruturais observadas ao MET.....	48
Figura 16	Curva de parasitemia – Tratamento com K1.....	49
Figura 17	Curva de sobrevivência - Tratamento com K1.....	50
Figura 18	Curva de parasitemia – Tratamento com K3.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teste de inibição (IC_{50}) para os compostos K1 e K3 nas cepas Y e Colombiana do <i>T. cruzi</i>	39
Tabela 2	Citotoxicidade (LC_{50}) e índice de seletividade (IS) para os compostos K1 e K3 comparados ao controle.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBTC	Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hosp. São Rafael
CChC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DC	Doença de Chagas
ECG	Eletrocardiograma
DMSO	Dimetilsulfóxido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration 50%</i>
I.P.	Intraperitoneal
IS	Índice de Seletividade para um composto
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K1	Vitamina K 1 – Fitomenadiona
K3	Vitamina K 3 – Menadiona
LC ₅₀	<i>Lethal concentration 50%</i>
LD ₅₀	<i>Lethal dose 50%</i>
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NO	<i>Nitric oxide</i> (óxido nítrico)

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão Fosfato)
P.I.	Pós-infecção
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TR	Tripanotiona redutase
V.O.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 Aspectos socioeconômicos na doença de Chagas.....	17
	2.2 Apresentação e manifestações clínicas na doença de Chagas.....	18
	2.2.1 O ciclo de vida e invasão celular do <i>T. cruzi</i>	21
	2.3 Alvos moleculares anti- <i>T. cruzi</i>	23
	2.4 Moléculas de naftoquinona e vitamina K.....	25
3	OBJETIVOS	30
	3.1 Geral.....	30
	3.2 Específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
	4.1 Animais.....	31
	4.2 Parasitos.....	31
	4.3 Cultivo dos parasitos.....	31
	4.4 Testes <i>in vitro</i>	32
	4.4.1 Inibição de proliferação e viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por K1 e K3.....	32
	4.4.2 Inibição de viabilidade de formas tripomastigotas por K1 e K3..	32
	4.4.3 Obtenção de células do baço.....	33
	4.4.2 Ensaio de citotoxicidade.....	33
	4.4.5 Inibição da proliferação de formas amastigotas por K1 e K3.....	34
	4.4.6 Avaliação de alterações ultraestruturais nos parasitos tratados com K1 e K3.....	35
	4.4.6.1 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
	4.4.6.2 Análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	36

4.5 Testes <i>in vivo</i>	36
4.5.1 Tratamento com K1.....	36
4.5.2 Tratamento com K3.....	37
4.5.3 Análise de parasitemia <i>in vivo</i>	38
4.5.4 Avaliação de sobrevida <i>in vivo</i>	38
4.5.5 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Avaliações <i>in vitro</i>	39
5.1.1 Atividade tripanocida <i>in vitro</i>	39
5.1.2 Citotoxicidade dos compostos aos explenócitos murinos	40
5.1.3 Ensaio de infecção em macrófagos.....	41
5.1.4 Alterações ultraestruturais.....	46
5.2 Avaliações <i>in vivo</i>	49
6 DISCUSSÃO	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, descoberta e caracterizada pelo cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, em 1909, ainda representa um importante problema de saúde na América latina. Apesar de completado o centenário de sua descoberta, a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considera um agravo ainda negligenciado (MALAFAIA, 2010; OMS, 2002).

Estimativas recentes apontam que, mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas cronicamente e cerca de 50 mil novos casos ocorrem por ano (OMS, 2010). No Brasil, dados mais atuais estimam que existam cerca de três milhões de portadores crônicos (OMS, 2010; FIOCRUZ, 2011).

Em 2008, a doença de Chagas matou cerca de 10.000 pessoas e mais de 25 milhões podem estar sob o risco de transmissão, em aproximadamente 18 países. A globalização populacional e a imigração internacional tem difundido a apresentação da doença em diversos países do mundo, mesmo em países onde não há presença do vetor triatomíneo, (OMS, 2010; FIOCRUZ, 2011). No período de 2000 a 2010 foram registrados 945 casos da doença de Chagas em fase aguda no Brasil, (Fig.1) (SVS/MS 2010; *apud* TEIXEIRA, 2011).

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, que possui um único flagelo e uma organela especializada, o cinetoplasto, caracterizado por uma condensação de cDNA localizado no interior da mitocôndria. (BRENER *et al*, 2000; JORGE *et al*, 2000). Este protozoário é capaz de infectar diferentes tipos celulares do hospedeiro mamífero, como macrófagos e células musculares, incluindo os cardiomiócitos. (BRENER *et al*, 2000). Após a infecção, este parasito se replica em diferentes tecidos e órgãos e é facilmente encontrado no sangue (SOARES *et al*, 2007).

A DC é transmitida, principalmente, durante o repasto sanguíneo de vetores triatomíneos, através das suas fezes contaminadas com o protozoário *T. cruzi*, ou por transfusão de sangue, transplante de órgãos contaminados e transmissão congênita. (BRENER *et al*, 2000).

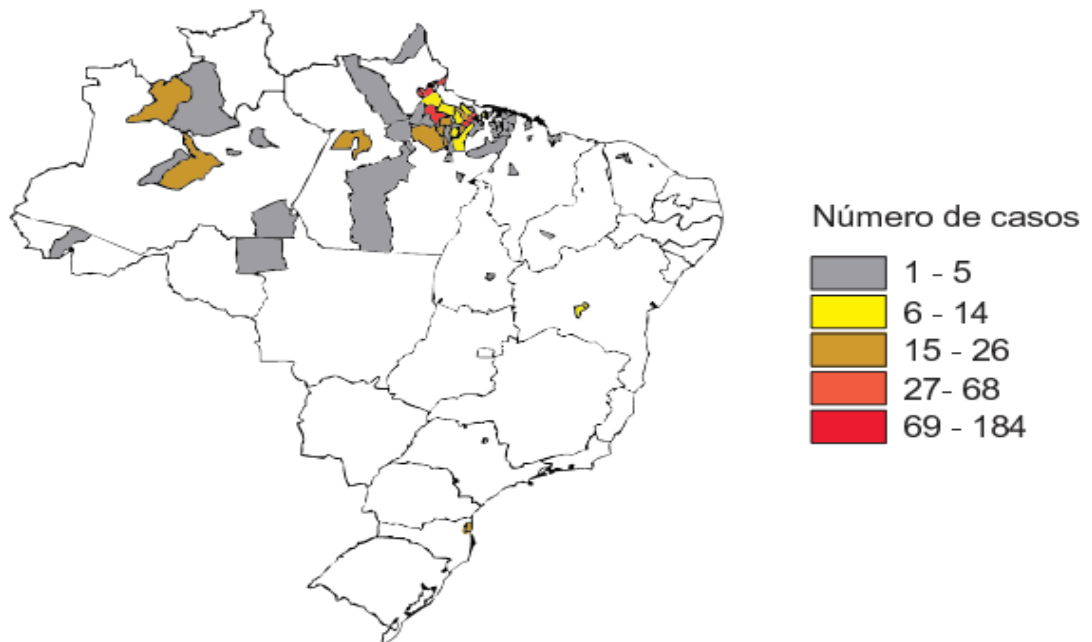


Figura 1 - Número de casos da doença de Chagas na fase aguda por regiões do Brasil no período de 2000 a 2010. Fonte: SVS/MS 2010; *apud* TEIXEIRA, 2011.

Um dos principais vetores para a doença de Chagas é o *Triatoma infestans*. Outras espécies também são responsáveis pela transmissão vetorial da doença de Chagas, insetos da família *Reduviidae*, bem como: *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma tibiamaculata*, *Triatoma dimidiata*, entre outros. (BRENER *et al*, 2000; DIAS LIMA, *et al*, 2000).

Um grande esforço tem sido realizado a fim de erradicar esses vetores, e o Brasil é um exemplo de país onde esta campanha tem alcançado grande sucesso. Em junho de 2006, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a OMS concedeu ao Brasil a certificação de reconhecimento sobre a eliminação da transmissão da doença de Chagas através do vetor, inseto da espécie *Triatoma infestans*, e pela via transfusional devido às diversas campanhas de erradicação realizadas (MALAFAIA *et al*, 2010).

Outra forma de infecção é apontada como responsável por recentes surtos da doença. A transmissão via oral ou alimentar, que ocorre através da ingestão de alimentos e bebidas contaminados com vetores triatomíneos infectados ou o próprio parasito, penetrando de forma ativa através da mucosa oral. Relatos também indicam o aparecimento desta doença em várias regiões do mundo devido aos episódios de

imunossupressão em indivíduos infectados pelo HIV e pelo intenso crescimento da migração populacional (FIOCRUZ, 2011).

Mesmo que a transmissão da doença fosse totalmente erradicada, ainda restaria uma população com cerca de 7,5 milhões de pacientes com as manifestações crônicas da doença de Chagas, dentre elas, a cardiomiopatia chagásica (RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001).

A doença de Chagas pode ser caracterizada em duas diferentes fases: aguda e crônica. A fase aguda corresponde à infecção e à disseminação do protozoário no organismo e apresenta manifestações com duração variável de 4 a 8 semanas. É caracterizada por intensa parasitemia e responsável pela morte em aproximadamente 10% dos casos, geralmente crianças, podendo ocasionar insuficiência cardíaca ou meningoencefalite. Nesta fase, observam-se também anticorpos circulantes contra vários antígenos do *T. cruzi*. (CANÇADO, 1985; CUNHA-NETO, *et al*, 1998).

Após a fase aguda, a doença de Chagas evolui para fase crônica, caracterizada por duas formas distintas: indeterminada e crônica sintomática, esta última podendo se apresentar sob as formas cardíaca, digestiva ou mista. A maioria dos indivíduos infectados desenvolve a forma indeterminada, sem sinais ou sintomas clínicos. Contudo, 30% dos indivíduos infectados, 5 a 30 anos após a infecção primária, evoluem para a forma sintomática da fase crônica (SOARES *et al*, 2007; CUNHA-NETO, *et al* 1998), caracterizada pela baixa parasitemia, porém com lesão tecidual e altos índices de anticorpos IgG (ANDRADE *et al*, 2000). As manifestações clínicas desta forma incluem distúrbios cardíacos, digestivos ou neurológicos (DIAS E COURA, 1997).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de promover alternativas terapêuticas aos pacientes acometidos pela doença de Chagas. Contudo, o negligenciamento desta doença ainda faz com que existam poucas opções terapêuticas disponíveis ao tratamento da infecção pelo *T. cruzi*. Desta forma, há uma necessidade de pesquisas contínuas nesta área, com o objetivo de oferecer alternativas terapêuticas e desenvolvimento de fármacos com maior eficácia (DIAS, 2009).

A atuação dos fármacos atualmente utilizados no tratamento da doença de Chagas está associada ao efeito tripanocida, ou antiparasitário, como exemplo o benzonidazol e o nifurtimox, únicas drogas utilizadas com atuação antiparasitária.

Cerca de 40% dos pacientes tratados com o nifurtimox relatavam efeitos colaterais. O benzonidazol é a única droga antiparasitária disponível no Brasil para o tratamento etiológico da doença de Chagas. Possui ação sobre o parasito, principalmente na fase aguda, contudo, não possui ação efetiva na fase crônica (ROMANHA, 2010). Dentre os efeitos colaterais associados ao seu uso, é possível destacar: reações cutâneas, gastrointestinais, hipertermia, náuseas, cefaléia, vertigem, parestesias ou polineurites periféricas, dermatites ou até depressão da medula óssea (BRENER, 2000). Dados recentes indicam que o benzonidazol pode reduzir as arritmias cardíacas em modelos experimentais de cardiomiopatia crônica (GARCIA, *et al*, 2005).

Há mais de 40 anos, estas drogas antiparasitárias são utilizadas, porém, apesar dos seus efeitos deletérios e resultados parciais, o mercado ainda não oferece outras opções de maior eficácia para o tratamento da doença de Chagas (ANDRADE *et al*, 2000; ROMANHA, 2010).

Além da citotoxicidade característica, diversas cepas de *T. cruzi* vêm apresentando resistência a estas drogas, bem como sua limitada ação em fase crônica da doença, o que requer, portanto, a necessidade de buscas de um novo arsenal quimioterápico (MARIN-NETO *et al*, 2009).

A existência destas cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes às drogas administradas no tratamento da doença de Chagas, além das reações adversas e a ineficácia das terapêuticas atuais, justifica a importância de pesquisas relacionadas a esta temática.

Neste cenário, diversos trabalhos buscam investigar possíveis opções terapêuticas anti-*T. cruzi*. Alguns estudos evidenciam o potencial terapêutico de moléculas derivadas de naftoquinonas. Estas moléculas possuem propriedade redox envolvidas em diversos processos oxidativos celulares (SOEIRO *et al*, 2011; GOODMAN e GILMAN'S, 2011) e estudos sugerem a sua capacidade em inibir a tripanotona reductase, uma enzima específica do *T. cruzi*, responsável pelo controle do excesso de radicais oxidativos neste parasito e ausente nas células de mamíferos (SALMON-CHEMIN *et al*, 2000). A possível atuação de moléculas de naftoquinona como inibidora dos triponossomatídeos, define a meta deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos socioeconômicos na doença de Chagas

A doença de Chagas ainda é um importante problema de saúde e socioeconômico para muitos países da América Latina, afetando, como descrito, mais de 10 milhões de pessoas e causando milhares de mortes a cada ano (OMS, 2010). A doença de Chagas é uma das maiores causas de morte por falência cardíaca na América Latina. A destruição progressiva do miocárdio ocorre em cerca de 30% dos indivíduos infectados por *T. cruzi*, causando a cardiomiopatia chagásica crônica (CChC) (RASSI, 2009).

Esta manifestação cardíaca tem, frequentemente, um curso fatal, já que o tratamento é sintomático e a única opção terapêutica para os pacientes que evoluem para uma fase de insuficiência cardíaca crônica descompensada é o transplante cardíaco, que apresenta várias limitações, como o alto custo e a necessidade do uso de drogas imunossupressoras, que podem reativar a parasitemia latente e persistente na fase crônica da infecção, além da possibilidade da realização dos transplantes cardíacos serem bem menores do que a demanda.

O agravamento da doença de Chagas na fase crônica representa um problema de saúde pública e de ordem econômica, visto que estes indivíduos, em geral, estão na faixa etária economicamente ativa. O custo de cada 100 mil pessoas infectadas, incluindo tratamento médico e as ausências no trabalho, ultrapassa cerca de 50 milhões de dólares por ano (OMS, 2002).

Desta forma, o desenvolvimento de esquemas terapêuticos com maior viabilidade à aplicação e à acessibilidade aos medicamentos, torna-se crucial para o sucesso e adesão ao tratamento, visto que a grande parcela dos infectados residem em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos.

Portanto, especialmente depois que forem equacionados os principais problemas de prevenção da transmissão da doença, resta o desafio de evitar a progressão da forma sintomática de milhões de indivíduos já infectados pelo *T. cruzi*. Mas para tal, é

de extrema relevância que se elucide e compreenda a fisiopatologia da doença de Chagas, bem como, se estabeleçam estratégias terapêuticas com potencial tripanocida de alta eficácia, viável e sem, ou com efeitos colaterais bem toleráveis.

2.2 Apresentação e manifestações clínicas na doença de Chagas

Na fase aguda, a doença de Chagas é manifestada por uma lesão inflamatória no local de entrada do parasita no organismo, denominada de chagoma de inoculação e o sinal de Romaña (edema bpalpebral unilateral), muitas vezes associado a uma linfadenopatia focal, (DIAS E COURA, 1997; TANOWITZ, 1992). Outras manifestações podem incluir hipertermia ou pirexia, hepatoesplenomegalia, náuseas, vômitos, diarreia e anorexia. O período de incubação da fase aguda varia de 4 a 15 dias para a transmissão via vetorial (inseto triatomíneo) e 22 dias na contaminação por via oral. Uma pequena parcela de pacientes infectados em fase aguda desenvolve uma miocardite, com a presença de focos de exsudatos inflamatórios com predominância de células mononucleares. (SOARES, *et al*, 2001; JORGE, 2000; TANOWITZ, 1992).

Pacientes infectados e na fase aguda da doença de Chagas podem apresentar uma miocardite, evidenciada clinicamente por taquicardia, insuficiência cardíaca, prolongamento do intervalo P-R no eletrocardiograma (ECG) ou uma meningoencefalite. Apesar da não existência de dados referentes ao percentual de indivíduos sintomáticos em fase aguda, a maioria dos pacientes recuperam-se completamente entre 3 a 4 meses, após a infecção. Após este período, formas amastigotas do *T. cruzi* são evidenciadas na musculatura cardíaca e esquelética (DIAS E COURA, 1997; TANOWITZ, 1992).

Segundo Ribeiro-dos-Santos e colaboradores (1992), os mecanismos de imunidade celular na fase aguda da infecção estariam associados às lesões difusas do miocárdio e de fibras cardíacas não parasitadas e a cardite que ocorre na fase crônica da infecção experimental é dependente de uma subpopulação de linfócitos CD4⁺ autorreativos para o miocárdio.

Diversos autores defendem a hipótese que a formação dos complexos imunes estão envolvidos na patogênese das lesões necrótico-inflamatórias em músculos

cardíacos de camundongos, em estudos experimentais na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, demonstrando a presença de depósitos de imunoglobulina e ativação do sistema complemento (BRENER, *et al*, 2000).

Após a fase aguda, que pode ser assintomática (inaparente) ou sintomática (aparente), os pacientes evoluem para uma fase crônica que pode ser apresentada como forma indeterminada, com ausência de manifestações clínicas, mas, com positividade sorológica (SOARES, *et al*, 2007; DIAS E COURA, 1997), e a forma crônica sintomática, caracterizada por importantes manifestações clínicas que ocorrem décadas após infecção. Estas manifestações podem ser classificadas em forma cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica - CChC), forma digestiva (megacólon e megaesôfago), neurológicas ou mistas (DIAS E COURA, 1997; TANOWITZ, 1992; SOARES *et al*, 2007).

Em modelos experimentais, a resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*, pode ocorrer através da formação de células T efetoras que migram para tecidos linfoides desenvolvendo uma resposta imune local e secretando diferentes citocinas importantes no controle da infecção. Diversos estudos demonstram que além dos macrófagos, células T CD4⁺ e CD8⁺ são importantes no controle da infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1991; CARDILLO, *et al*, 2007). As células apresentadoras de antígeno, como macrófagos, células dendríticas e células B, são importantes na manutenção e ativação de células T. Estudos demonstram especificamente, que as células B possuem importante função no controle do parasito intracelular durante a fase aguda de infecção, participando da ativação das células T (CARDILLO, *et al*, 2007).

Em relação ao diagnóstico laboratorial de pacientes infectados com o *T. cruzi*, em fase aguda, é possível evidenciar manifestações diversas, como quadros de anemia, trombocitopenia, leucocitose com predominância de linfocitose, alterações de função hepática e elevação de enzimas cardíacas. Contudo, estes achados laboratoriais podem ser inespecíficos e comuns a outras doenças infecciosas, (DIAS E COURA, 1997), não podendo ser utilizados como diagnóstico definitivo. Para tal, se faz necessário a realização de exames complementares, como testes sorológicos específicos de IgM anti-*T. cruzi*, ou teste com metodologia *Western Blot*.

Percebe-se que as manifestações clínicas de pacientes com a doença de

Chagas em fase aguda, são autolimitadas, excetuando os pacientes que apresentam meningoencefalite ou miocardite, que são manifestações graves e acometem principalmente crianças e pacientes imunossuprimidos.

Entretanto, em relação às manifestações da fase crônica da doença, a literatura descreve muitos aspectos relacionados sua fisiopatologia. A presença de pacientes na fase indeterminada da doença que não apresentam manifestações clínicas da doença de Chagas, ainda é questionada, pois dos pacientes infectados, cerca de 30% evoluem para a fase crônica. Higuchi e colaboradores (1997) sugerem que a simples presença do *T. cruzi* no tecido cardíaco não é suficiente para a indução da miocardite e sua destruição.

Na cardiomiopatia chagásica crônica, ocorre um considerável infiltrado inflamatório difuso, em um processo que sugere uma reação de hipersensibilidade tardia. As células presentes no infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de pacientes que apresentam a cardiomiopatia chagásica são possivelmente os responsáveis pelo dano (HIGUCHI, 1997; RASSI, *et al*, 2009).

Segundo Soares e colaboradores (2001), diversas hipóteses podem explicar a fisiopatologia na cardiomiopatia chagásica. (1) A presença de antígenos de *T. Cruzi* em locais de persistência do parasito pode estar associado à resposta inflamatória patogênica. (2) Uma definição como doença autoimune desencadeada em alguns indivíduos após infecção pelo *T. Cruzi*. (3) O desencadeamento de reações de hipersensibilidade tipo tardia.

Dentre estas hipóteses, diversos autores afirmam o componente da autoimunidade, no desenvolvimento de uma resposta imunológica contra alguns antígenos do *T. cruzi* que possivelmente apresentam um mimetismo molecular aos componentes da estrutura cardíaca, ocasionando uma reação cruzada, responsável pela destruição tecidual (RIBEIRO-DOS-SANTOS, *et al*, 2001; PONTES DE CARVALHO, *et al*, 2002; CUNHA NETO, 1998; KALIL, 1996).

Rassi e colaboradores (2009) também defendem que a miocardite linfocitária fibrosante é causada por uma resposta autoimune contra epítomos próprios da estrutura proteica miocárdica, devido ao mimetismo das estruturas de miosina cardíaca pelos antígenos parasitários.

2.2.1 O ciclo de vida e invasão celular do *T. cruzi*

Os tripanossomatídeos possuem um complexo estágio de desenvolvimento entre os insetos da família Reduviidae e os animais vertebrados, como o homem. Nos triatomíneos o *T. cruzi* reproduzem-se na forma epimastigota. Após sua fixação nas membranas perimicrovilares da células intestinais do inseto, são transformados na forma infecciosa, tripomastigota metacíclica e liberados nas suas fezes (Fig. 2) (BRENER, *et al*, 2000; DE SOUZA, *et al*, 2010).

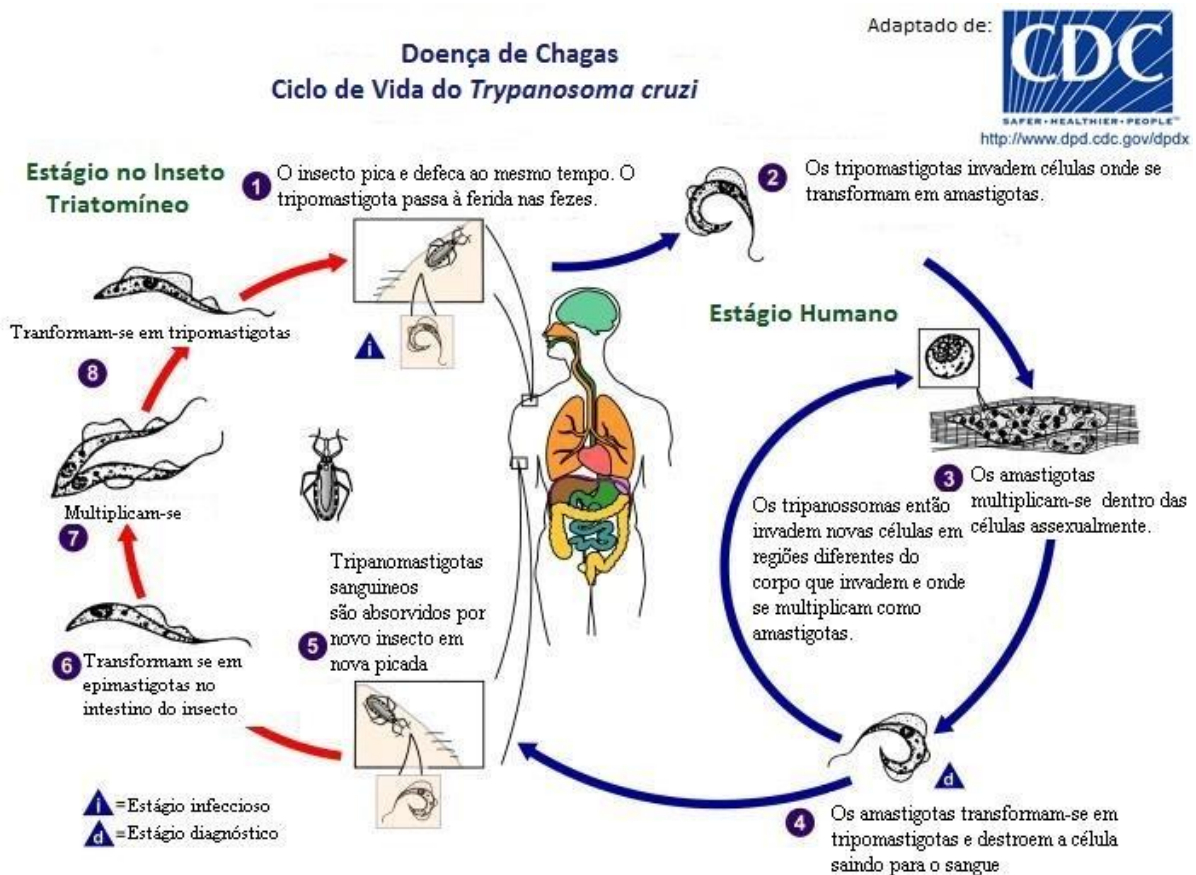


Figura 2 - Ciclo de vida clássico do *Trypanosoma cruzi* através do vetor triatomíneo. (Adaptado: doença de Chagas - Centers for Disease Control and Prevention, 2011 - http://www.cdoença_de_Chagas.gov/parasites/chagas/).

A infecção pode ocorrer por diversas vias, como a inoculação na mucosa ocular, na pele lesionada durante a picada do inseto, ou através de diferentes formas.

Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas podem invadir células como: epiteliais, macrófagos e fibroblastos. Durante a invasão celular, há a formação de um vacúolo endocítico, denominado de vacúolo parasitóforo (ANDRADE, 1999).

Segundo De Souza e colaboradores (2010), o processo de interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira, pode ser classificado em três fases: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. O processo de adesão envolve receptores em domínios de membrana.

Após a adesão celular da forma tripomastigota à membrana celular, inicia-se um processo de internalização via fagocitose, com a formação de pseudópodes e o recrutamento de lisossomos para o local de invasão do parasito, porém, o parasito não é afetado.

O processo de invasão envolve a presença de diversos ligantes da superfície do parasito com receptores presentes na superfície da célula infectada (DE SOUZA, *et al*, 2010).

De Souza e colaboradores (2010), apontam pelo menos três mecanismos distintos de invasão da célula hospedeira: (a) via dependente de lisossomas, no qual ocorre uma exocitose de lisossomas reguladas pelo Ca^{2+} ; (b) penetração dos tripomastigotas por uma via dependente da actina, com expansão da membrana plasmática e formação do fagolisossomo; (c) os parasitos entram na célula através de invaginações da membrana plasmática onde são acumulados os fosfolípidios de inositol como o PIP-3, moléculas hidrossolúveis que atuam como mediadores intracelulares.

No interior do vacúolo, os tripomastigotas transformam-se em formas amastigota, capazes de sofrerem replicação por fissão binária.

Após processo de replicação, os amastigotas, já multiplicados sofrem um período de diferenciação, transformando-se novamente em tripomastigotas, que são liberados no espaço extracelular e disseminam-se sobre os fluidos sanguíneos (TEIXEIRA, *et al*, 2012).

2.3 Alvos moleculares anti-*T. cruzi*

Diversos estudos são realizados com o objetivo de encontrar moléculas no metabolismo dos tripanossomatídeos, com potencial para alvo na quimioterapia contra o parasito. A literatura já descreve diversos alvos potenciais contra o *T. cruzi*, dentre eles destacam-se: enzimas da síntese de esteróis – hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA), cisteínas proteases, diidrofolato redutase, hypoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, bem como, a enzima tripanotiona redutase (TR) (SOEIRO, 2008; 2011).

Sabe-se que em diversos tipos celulares, um dos principais mecanismos de controle do estresse oxidativo intracelular são as enzimas catalase ou glutathione redutase. Entretanto, o *T. cruzi*, não possui estas enzimas. Neste parasito, principal mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo está relacionado às enzimas de tióis de tripanotiona (Fig. 3), essencial para a sua sobrevivência, promovendo a proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) (OLIVEIRA, 2008).

Uma redução nos níveis dos tióis antioxidantes ocasionaria uma alta susceptibilidade do parasito aos efeitos dos radicais livres, resultando em dano na estrutura celular e induzindo a apoptose e morte celular (OLIVEIRA, 2008). Nos protozoários, as espécies reativas de oxigênio podem ser formadas através da metabolização de drogas (TURRENS, 2004).

Desta forma, uma das candidatas à molécula alvo é a enzima Tripanotiona Redutase (TR), descoberta em 1985 (FAIRLAMB *et al*, 1985) e, atualmente, validado como um importante alvo molecular na quimioterapia contra a doença de Chagas (OLIVEIRA, 2008).

A tripanotiona redutase é classificada como uma flavoenzima NADPH dependente, da família das FAD-disulfeto oxiredutase, é um homodímero com dois sítios ativos, importante no controle do ciclo redox de parasitos tripanossomatídeos. A tripanotiona redutase apresenta 492 aminoácidos, com uma massa molecular de 54 kDa.

Meziane-Cherif e colaboradores (1994), realizaram estudos com anticorpos contra um peptídeo derivado da tripanotiona redutase e constataram que esta enzima

estaria localizada no citosol e na mitocôndria. Entretanto Wilkinson e colaboradores (2005) descreveram que a tripanotiona é principalmente encontrada no citosol, com uma fração de 15 a 20% presente no glicosomo.

Várias funções biológicas são descritas para a tripanotiona como: homeostase redox, síntese de desoxiribonucleotídeos pela ribonucleotídeo redutase, conjugação e exportação de metais e drogas, remoção glioxal e metabolismo de peróxido.

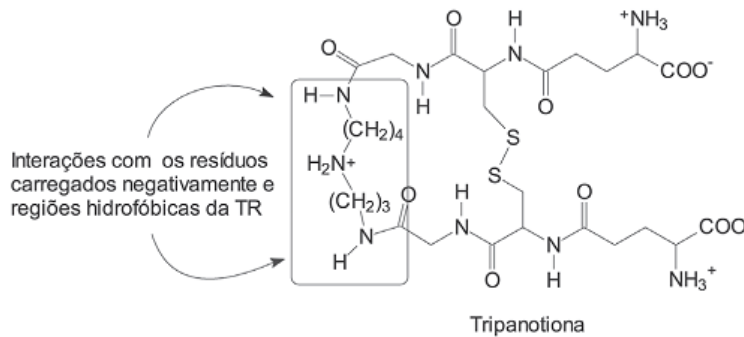


Figura 3 - Estrutura da Tripanotiona. Fonte: Oliveira *et al*, 2008.

A TR é responsável por catalisar a redução da tripanotiona dissulfeto $[T(S)_2]$ em tripanotiona ditiol $[T(SH)_2]$, ocasionando uma cascata de eventos que culminam na neutralização de espécies reativas de oxigênio (FAIRLAMB *et al*, 1985), como ilustrado na figura 4.

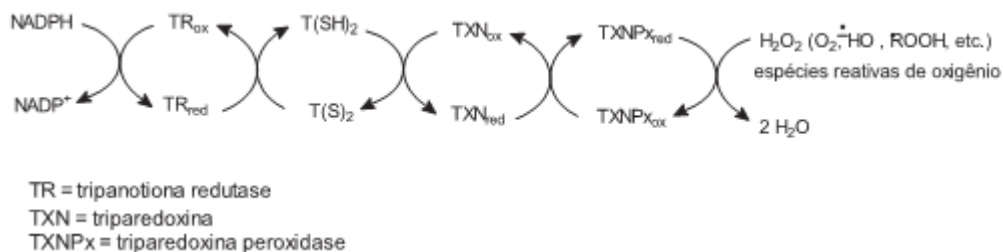


Figura 4 - Cascata de mecanismos enzimáticos que ocasionam a neutralização de radicais livres através da Tripanotiona Redutase. Fonte: Oliveira *et al*, 2008.

Alguns estudos indicam que a tripanotiona redutase é capaz de catalisar a redução de um elétron de compostos derivados de naftoquinonas. A redução destes compostos ocasiona uma auto-oxidação e a produção de ânion superóxido. Alguns autores mostram que estes compostos podem ser substratos para a TR do *T. cruzi*, com o oxigênio. Esta redução gera a produção de radicais livres que inibe a redução da tripanotiona e causa o consumo de NADPH (CASTRO e TOMÁS, 2008).

O uso da tripanotiona redutase como um alvo para a busca de novas drogas tripanocidas é objetivo de alguns estudos recentes. A literatura descreve que os derivados de quinonas, como naftoquinonas, podem, na presença do oxigênio, reduzir a tripanotiona redutase através de um mecanismo de transferência de elétrons, gerando radicais livres, inibindo a redução de dissulfeto e concomitantemente, formando ânions superóxidos. A tripanotiona redutase é capaz de catalisar a redução de um elétron dos derivados de naftoquinona (CASTRO *et al*, 2011).

O acúmulo de radicais superóxidos é extremamente letal para a célula, favorecendo um processo oxidativo e morte do protozoário (GIRALT, 1998; EBERLE, 2011). Desta forma, a tripanotiona redutase caracteriza-se como um importante alvo na elaboração de droga com possível efeito tripanocida.

2.4 Moléculas de naftoquinonas e vitamina K

A literatura descreve séries de moléculas com estrutura de naftoquinonas que possuem ação tripanocida, capazes de atuar como agentes microbicidas. Alguns estudos apontam possíveis efeitos tripanocidas de naftoquinonas sobre trypanosomas e diferentes leishmanias (SALMON CHEMIN, 2001; KUBATA, 2002). A molécula de naftoquinona sofre uma redução de um elétron para semiquinonas e reoxidação espontânea deste radical por oxigênio molecular gerando a outras espécies tóxicas do oxigênio (MOLINA POTELO, *et al*, 1996). A figura 5 ilustra as vias de oxidação-redução dos derivados de vitamina K.

As naftoquinonas atuam inibindo enzimas que participam do processo anti-oxidativo do protozoário Kinetoplastida. Dentre estas enzimas, destaca-se a

tripanotiona redutase e a enzima *old yellow* do *T. cruzi* (TcOYE) (SALMON-CHEMIN, 2000).

Kubata e colaboradores (2002), afirmam que derivados de naftoquinonas exercem sua ação tripanocida através da geração de radicais livres, por um processo de ciclo redox. Portanto, a 1,4 naftoquinona apresenta ação oxidante, exercendo efeito de lise e podendo atuar como droga tripanocida.

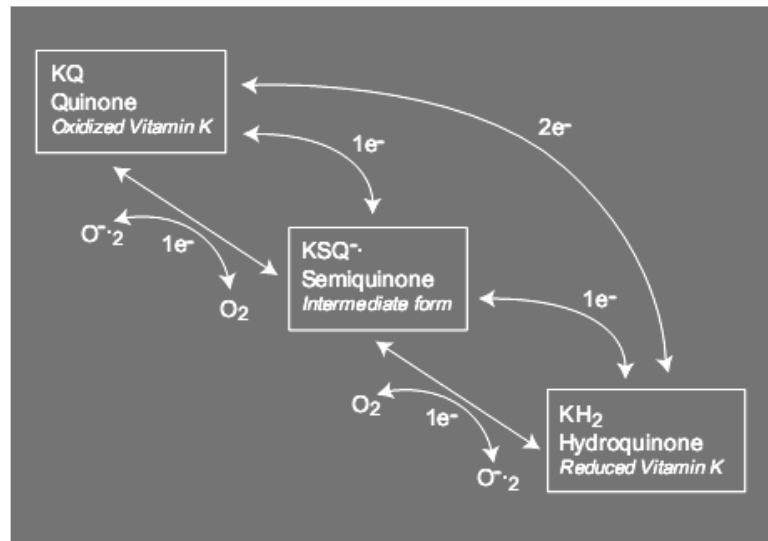


Figura 5 - Ciclo Redox proposto da Vitamina K. Fonte: LAMSON, 2003.

Outro estudo relacionado ao estresse oxidativo no parasita, mostram que duas substâncias que possuem a molécula da naftoquinona natural, o lapachol e β -lapachone inibiram progressivamente a motilidade de formas epimastigotas do *T. cruzi*, em meios de cultura, com atividade similar ou superior aos tripanocidas tradicionais (SALAS, 2008).

Segundo Castro e colaboradores (2011), derivados de naftoquinonas aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio através da formação de radicais semiquinonas. Sabe-se que o *T. cruzi* é deficiente quanto à desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e sensível às condições de estresse oxidativo.

Em estudo conduzido por Salas e colaboradores (2008), a naftoquinona CS-3 apresentou efetiva inibição do *T. cruzi* (cepa Tulahuen, LQ e clonar DM28c), em concentrações que variam 2,1 a 5,2 μ M.

Em outro estudo realizado por Morello e colaboradores (1995), moléculas derivadas da naftoquinona, como o furano-4,9-quinona (CS-3), extraído de *Calceolaria sessilis*, foram testadas para inibição de formas epimastigotas do *T. cruzi* apresentando uma expressiva inibição do crescimento do parasito. Neste estudo, a naftoquinona apresentou ainda um aumento temporário na produção de oxigênio pelo *T. cruzi*, sugerindo, também, uma formação e participação de radicais livres.

A estrutura base de naftoquinona, está presente em moléculas como a vitamina K. Esta vitamina, isolada em 1939 por Henrick Dam, é usada para tratamento de deficiências nutricionais em casos de redução dos níveis de protrombina, sendo uma proteína essencial no mecanismo de coagulação. Atua na modificação pós-traducional de proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação, como fatores II (protrombina), VII, IX e X e as proteínas C, S e Z. O termo “K” refere-se a “*koagulations vitamin*” (LAMSON, 2003).

Furie e colaboradores (1990) descrevem que a vitamina K atua como um cofator essencial para enzimas microsossomais responsáveis por catalisar a carboxilação pós-traducional de resíduos de ácido glutâmico em percussores hepáticos inativos dos fatores de coagulação. O resíduo de ácido γ -carboxiglutâmico converte os percussores em fatores ativos que são secretados nas células do fígado para o sangue.

A vitamina K tem característica lipossolúvel, e é encontrada na natureza sob duas formas: a vitamina K1, filoquinona, presente nos vegetais, e a vitamina K2, menaquinona, oriunda da produção endógena das enterobactérias. A vitamina K sinteticamente produzida é denominada K3 ou menadiona (FIGUEREDO, 1998; GOODMAN e GILMAN'S, 2001).

A vitamina K possui em sua estrutura básica a molécula de naftoquinona, e diversas isoformas de vitamina K são apresentadas, dentre elas, a fitomenadiona (K1) e a menadiona (K3). A fitomenadiona compõe o grupo da vitamina K1 e também apresenta o grupo funcional de naftoquinona. Ela é usada em tratamento clínico como fármaco pró-coagulante. A vantagem da utilização da K1 no reposicionamento para

novas aplicações clínicas e indicações terapêuticas, (ASHBURN e THOR, 2004), está associada à baixa toxicidade e uso clínico aprovado inclusive, em pacientes pediátricos.

A fitomenadiona possui ação semelhante a todas as vitaminas K, como descrito, age como cofator essencial na formação dos fatores de coagulação: fator II (protrombina), fatores VII, IV e X e dos inibidores da coagulação: proteína C e S (FURIER, 1990).

A fitomenadiona – K1 (Fig.6) possui peso molecular de 450.69574 g/mol, possui fórmula molecular $C_{31}H_{46}O_2$. Apresenta uma cadeia lateral e presença de unidade isoprenóide. Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), a sua nomenclatura corresponde a: *2-methyl-3-[(E)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-enyl] naphthalene-1,4dione*, (NCBI – PUB CHEM COMPOUND, 2011).

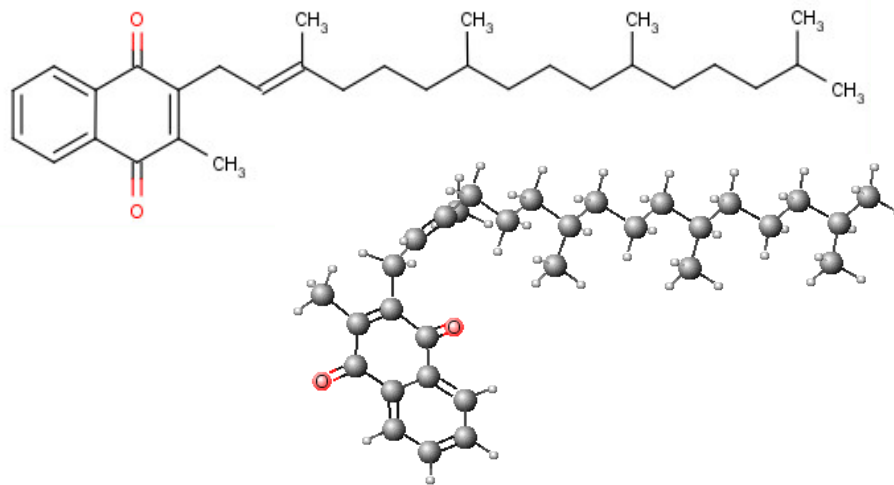


Figura 6 - Estrutura molecular plana e tridimensional da K1. **Fonte:** NCBI Pubmed – ChemIDplus Advanced – National Library of Medicine (Molecular Networks, 2011).

A K1 é absorvida no intestino delgado, com passagem predominantemente hepática, ligando-se às lipoproteínas VLDL. Possui uma meia-vida plasmática de 1,5 a 3 horas e gera metabólitos polares como a fitomenadiona 2,3-epóxido excretados na bile por glucoronídeos e sulfoconjugados (GOODMAN e GILMAN'S, 2001; IARC MONOGRAPHS, 2010).

A menadiona, especificamente, pertence à família dos compostos de vitamina K3, possui em sua estrutura base o 2-metil-1,4-naftoquinona, com ausência de cadeia lateral isoprenóide. Alguns autores a consideram como uma pró-vitamina, por sofrer

conversão para menaquinona (KATHLEEN, 2008). A menadiona (Fig. 7) possui um peso molecular de 172,180 g/mol, de fórmula química: $C_{11}H_8O_2$. Pela IUPAC sua nomenclatura é definida como: *2-methylnaphthalene-1,4-dione*.

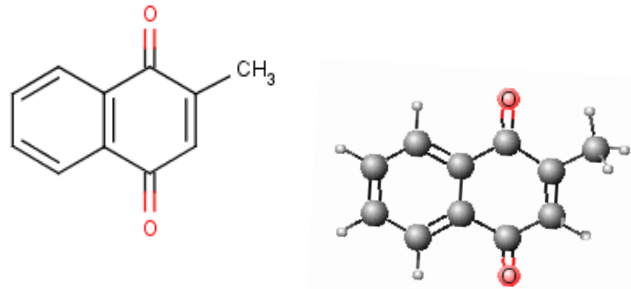


Figura 7 - Estrutura molecular plana e tridimensional da K3. **Fonte:** NCBI Pubmed – ChemIDplus Advanced – National Library of Medicine (Molecular Networks, 2011).

É perceptível que tanto a K1 como a K3 possuem em sua estrutura base, a 1,4 Naftoquinona, pois são compostas por um anel naftaleno e radicais carbonila na posição 1,4. O esqueleto naftoquinona é idêntico, variando apenas na presença, ou não, de cadeia lateral e unidades isoprenóides.

No organismo, após absorção, a vitamina K é reduzida a hidroquinona na presença de NADH ou NADPH. Posteriormente, é oxidada à vitamina K 2,3 epóxido e atua como cofator junto à alfa carboxilase na carboxilação de radicais de ácido glutâmico a ácido carboxiglutâmico, criando, com isso, sítios de ligação para o cálcio nessas proteínas. Quando esse processo não se completa, formam-se proteínas vitamina K dependentes imaturas (FIGUEREDO, 1998).

Na forma reduzida, a hidroquinona atua como um cofator da carboxilação enzimática pela gama glutamil carboxilase de resíduos de ácido glutâmico, formando o ácido gama-carboxiglutâmico em proteínas plasmáticas (FURIE, 1990).

Portanto, a comprovação da eficácia tripanocida de compostos que apresentem como componente básico a naftoquinona poderá servir de base para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para a doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Investigar o potencial efeito de derivados de vitamina K sob diferentes formas do *T. cruzi*.

3.2 Específicos

- Investigar o efeito anti-*T. cruzi* da K1 e K3 através dos ensaios de inibição de crescimento e diferenciação de formas epimastigotas e tripomastigotas, bem como na inibição da proliferação intracelular de formas amastigotas em macrófagos murinos;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos K1 e K3 em esplenócitos murinos;
- Avaliar alterações ultraestruturais no parasito em resposta ao tratamento com K1 e K3;
- Avaliar o efeito anti-*T. cruzi* da K1 e K3 na fase aguda da infecção *in vivo*, utilizando modelos murinos de infecção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para este estudo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) nas linhagens C57BL/6 e BALB/c, fêmeas, com idade entre 2 a 3 meses, provenientes do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em condições de alimentação *ad libitum* e *pathogen-free*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais/CEUA – FIOCRUZ – CPqGM nº.002/2011.

4.2 Parasitos

Formas tripomastigotas e epimastigotas das cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*, foram obtidas de amostras criopreservadas do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI – CPqGM- Fiocruz) de cepas virulentas humanas.

Tripomastigotas sanguícolas de cepas Y e Colombiana foram coletados de sangue de animais da linhagem BALB/c infectados em sucessivas passagens e utilizados para infecção dos modelos experimentais *in vivo*.

4.3 Cultivo dos parasitos

As formas tripomastigotas dos parasitos *T. cruzi* foram cultivadas em meio de cultura rpmI (*Gibco®*, *Grand Island, USA*), suplementado com 10% de soro bovino fetal, (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BR), juntamente com células da linhagem LLC MK2, (células de rim de macaco Rhesus). As garrafas de cultura foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Formas epimastigotas do *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Gibco®*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma), 1% de hemina bovina e 1% de meio R9 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em estufa a 26 °C.

4.4 Testes *in vitro*

Para os ensaios de inibição de crescimento e proliferação das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* em cultura axênica foram utilizadas as cepas Y e Colombiana, para os testes de citotoxicidade em célula de mamífero foi utilizado o modelo de incorporação de [³H]-timidina e para avaliar a inibição de crescimento de formas amastigotas foram realizados ensaios de infecção de macrófagos peritoneais por *T. cruzi*, como seguem os protocolos abaixo:

4.4.1 Inibição de proliferação e viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* por K1 e K3

A proliferação e viabilidade foi avaliada por contagem em hemocítmetro com auxílio de microscopia óptica após cinco dias de incubação em estufa à 26° C e os resultados expressos em tabelas em relação ao controle do parasito cultivado sem a droga. As diferentes concentrações das drogas foram avaliadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitos (IC₅₀).

Formas epimastigotas das cepas Y e Colombiana foram plaqueadas (10⁶ parasitos/poço) em placas de 96 poços, em triplicata, em meio LIT (Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma), 1% de hemina bovina e 1% de meio R9 (Sigma). Nos poços controles foram plaqueados apenas parasitos. Nos poços teste, foram plaqueados os parasitos, as drogas K3 (Sigma Aldrich) nas concentrações de: 580,79; 193,58; 64,52; 21,48; 7,14; 2,38; 0,75; 0,61; 0,08; 0,02 µM e K1 (Kanakion^R Roche) nas concentrações de: 221,88; 73,95; 24,65; 8,20; 2,72 µM. As concentrações utilizadas foram pré-determinadas a partir de triagem inicial. Como controle positivo foi utilizado 38,42 µM de benzonidazol (Rochagan^R Roche)., os parasitos foram contados com auxílio de um hemocítmetro. Os resultados foram avaliados em relação ao controle sem a droga.

O valor da IC₅₀ foi determinado com base na porcentagem de inibição do crescimento do parasito em diferentes concentrações das drogas e seu cálculo foi efetuado utilizando-se regressão não-linear no programa *Prism 5.01 GraphPad*.

4.4.2 Inibição de viabilidade de formas tripomastigotas por K1 e K3.

A viabilidade dos parasitos foram avaliados por contagem em hemocítômetro com auxílio de microscopia óptica 24 horas após a incubação com os compostos em diferentes concentrações em estufa à 37°C e 5% de CO₂. As concentrações utilizadas foram pré-determinadas a partir de triagem inicial e comparadas pelo ensaio de citotoxicidade em esplenócitos de camundongo. Os resultados foram avaliados em relação ao controle sem droga e apresentados em forma de tabela.

Formas tripomastigotas das cepas Y e Colombiana foram obtidas da cultura de células MK2, adicionadas (4×10^5 parasitos/poço) em placas de 96 poços contendo meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/ml de gentamicina. Nos poços controles foram adicionados apenas parasitos. Nos poços teste foram plaqueados, além dos parasitos, as drogas: K3 nas concentrações de: 580,79; 193,58; 64,52; 21,48; 7,14; 2,38; 0,75; 0,61; 0,08; 0,02 µM e K1 em 221,88; 73,95; 24,65; 8,20; 2,72 µM. Como controle positivo foi usado 38,42 µM de benzonidazol (Rochagan[®] Roche).

4.4.3 Obtenção de células do baço

Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em câmara de CO₂ e os baços dos animais foram imediatamente removidos em condições assépticas. Cada baço foi macerado utilizando-se êmbolo de seringa de 3 mL estéril e as células obtidas do processo de maceração foram transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 1.500 rpm em 10 minutos. Após centrifugação, as células foram contadas em hemocítômetro e plaqueadas para a realização dos ensaios de citotoxicidade.

4.4.4 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos K1 e K3, foi utilizado o método de cultura de células através do teste de incorporação de ³H-timidina, o qual mede a viabilidade celular pela síntese de DNA, (HENSTEN-PETTERSEN, 1988).

Esplenócitos murinos na concentração de 6×10^5 /poço foram adicionados em placas de 96 poços contendo meio RPMI (Gibco) completo, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/ml de gentamicina. Estas células foram tratadas em diluições seriadas de menadiona (Vitamina K3 – Sigma Aldrich, EUA): 580,79; 193,58; 64,52; 21,48; 7,14; 2,38; 0,75; 0,61; 0,08; 0,02 µM e fitomenadiona (Vitamina K1 – Kanakion MM^R Roche Fontenay, França): 221,88; 73,95; 24,65; 8,20; 2,72 µM. No controle positivo foi utilizada a violeta de genciana, na concentração final de 245,11 µM. Para o controle negativo foram utilizadas apenas células diluídas em meio RPMI completo. Em cada poço, foi adicionado 1 µCi/poço de ³H-Timidina (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as placas foram lavadas e transferidas para um filtro de fibra de vidro utilizando um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA). Após 24 horas foi realizada a leitura em contador de radiação β (Multilabel Reader, Hidex Turku Finland). A quantidade de células foi avaliada pela contagem radioativa de timidina incorporada em fragmentos de base nucleotídica de células viáveis à replicação.

4.4.5 Inibição da proliferação de formas amastigotas por K1 e K3

Macrófagos murinos foram infectados com formas tripomastigotas induzindo o ciclo de replicação celular para a forma amastigota. A contagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago foi realizada através de observação em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão), após incubá-los com diferentes concentrações das drogas, tendo como objetivo, determinar o valor da IC₅₀ que foi calculado com base na porcentagem de inibição da infecção, utilizando-se regressão não-linear no programa *Prism 5.01 GraphPad*.

Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram injetados com 1,5 mL de tioglicolato a 3% em cavidade intraperitoneal para estimular a migração de macrófagos para o peritônio. Após 4 dias, o lavado peritoneal foi coletado para obtenção de macrófagos. $1,5 \times 10^5$ células/poço foram adicionadas em placa de 24 poços contendo meio RPMI (volume final de 1 mL) com lamínulas de vidro ao fundo. As células foram incubadas à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após lavagens sucessivas em meio RPMI, as células

foram infectadas com $1,5 \times 10^6$ parasitos por poço (tripomastigotas, cepa Y e Colombiana). As células infectadas foram incubadas em 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com salina. As drogas em teste foram adicionadas, a K1 (Kanakion MM Roche) nas concentrações de: 221,8 e 22,1 µM e a K3 (Sigma-Aldrich) nas concentrações de: 21,4; 2,14; 2,38 e 0,75 µM. A triagem para a definição das diluições foi realizado em experimentos pilotos prévios. Como controle positivo do experimento foi utilizado o benzonidazol (38,42 µM). O controle negativo correspondeu apenas de células infectadas com os parasitos. A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 6 horas. Os poços foram lavados 2 vezes com salina e em seguida, adicionou-se meio de cultura em cada poço. A cultura foi mantida à 37°C e 5% de CO₂ por 4 dias. Após este período, os poços foram novamente lavados com salina por 2 vezes. As células infectadas foram fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos a 4° C. Os poços foram corados com técnica de H&E e as lamínulas foram montadas em lâminas com auxílio de Entellan (Entellan®; MDA-CHEM-107960, Merck Química, Brasil).

4.4.6 Avaliação de alterações ultraestruturais nos parasitos tratados com K1 e K3.

4.4.6.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura - MEV

Formas tripomastigotas (3×10^7) foram submetidas ao tratamento com os compostos em testes - K1 e K3, nas concentrações correspondentes ao IC₅₀ e 5 µM durante 24 horas em meio de cultura. Após este período, o meio foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi encaminhado para o processamento em microscopia.

As amostras foram fixadas por 1 hora em temperatura ambiente com formaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e aderidas em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina (Sigma). Após a aderência, pós-fixados com uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Em seguida, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de

etanol (30, 50, 70, 90, e 100%), submetidas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV a 12 kV em unidade de microscopia eletrônica-UME do CPqGM – FIOCRUZ.

4.4.6.2 Análise por microscopia eletrônica de transmissão - MET

Para as análises ultraestruturais, amostras de *T. cruzi* da cepa Colombiana foram incubadas em 3×10^7 com os compostos K1 e K3 nas concentrações de IC₅₀, 5 µM durante 24 horas em meio de cultura. Após este período, o meio foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi encaminhado para o processamento.

Os parasitos foram fixados por 1 hora em temperatura ambiente com formaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. Após a fixação, os parasitos foram lavados, 3 vezes, com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), pós-fixados com uma solução de tetróxido de ósmio (Sigma) 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Subsequentemente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, e 100%) e incluídas em resina Polybed (Polysciences, Washington, PA, USA). O material foi acondicionado em tubos *ependorf* e colocado para polimerizar em estufa a 60°C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo *Leica* UC7 e coletados em grades de cobre com 300 *mesh*, contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (modelo: JEOL JEM-1230) a 15 kV na unidade de microscopia eletrônica - UME do CPqGM – FIOCRUZ.

4.5 Testes *in vivo*

4.5.1 Tratamento com K1

Camundongos da linhagem C57BL/6 (n=42) foram infectados com 10^3 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, por via intraperitoneal (IP). Os animais

foram tratados após 15 dias com 50 mg/kg de K1, via IP, baseado em protocolos de dose e diluição de Ogawa e colaboradores (2007). A droga K1 foi diluída em PBS e etanol a 2%. Os animais do grupo controle positivo foram tratados com 100 mg/kg de benzonidazol. Os animais foram dispostos nos seguintes grupos:

- Animais não infectados e não tratados: n= 7
- Controle positivo (animais infectados e tratados com o benzonidazol): n= 10
- Controle negativo (animais infectados e tratados com veículo): n= 10
- Grupo teste (animais infectados e tratados com K1): n= 15

4.5.2 Tratamento com K3

Camundongos da linhagem BALB/c (n=18) foram infectados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y por via IP. No sexto dia pós-infecção, os animais foram tratados com 25mg/kg de K3, via oral por gavagem, durante 4 dias.

Para este tratamento foi utilizado como referência, dose utilizada em trabalho de Mizushina colaboradores (2011), que sugerem 100 mg/kg. Porém, Parry e colaboradores (2009), afirmam em estudo, que uma dose tolerável abaixo do limiar de toxicidade para a menadiona corresponderia a 25 mg/kg. Optou-se então por fracionar em 4 doses de 25 mg/kg totalizando uma dose de 100 mg/kg. A K3 foi diluída em 5% de DMSO (dimetilsulfóxido – LGC Biotecnologia- 2010, Brasil) e em salina. Para o grupo controle positivo, foi utilizado 100 mg/kg de benzonidazol via oral.

Os animais foram separados nos seguintes grupos:

- Controle positivo (animais infectados e tratados com o benzonidazol-via oral): n = 6
- Controle negativo (animais infectados e tratados com veículo da droga-via oral): n= 6
- Grupo teste (animais infectados e tratados com K3-via oral): n= 6

4.5.3 Análise de parasitemia *in vivo*

Cerca de 5 μ L de sangue foi coletado da cauda dos camundongos infectados e disposto em lâmina, coberta com lamínula de 22x22 mm, obtendo-se uma camada única e homogênea de hemácias. As lâminas foram levadas diretamente ao microscópio óptico e realizado a contagem de 50 campos microscópicos aleatórios em objetiva de 40x. O número de parasitos encontrados foi dividido pelo número de campos microscópicos observados e multiplicado por um fator de 7. O resultado foi apresentado em gráfico com 10^5 tripomastigotas por mL. (Método de BRENER baseado no de PIZZI – BRENER, 1962; BRENER, 2000).

No grupo tratado com K1 (infectado com a cepa Colombiana) acompanhou-se a parasitemia do 15^o ao 30^o dia pós-infecção (contagem a cada 3 dias). O grupo da K3 (infectado com a cepa Y), a parasitemia foi acompanhada no 5^o, 8^o, 10^o e 12^o dia pós-infecção.

4.5.4 Avaliação de sobrevida *in vivo*

A mortalidade dos animais foi avaliada através de acompanhamento diário. A partir dos dados obtidos elaborou-se a curva de sobrevida dos animais tratados com auxílio do programa *Prism 5.01 GraphPad*.

4.5.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados com o auxílio do programa *Prism 5.01 GraphPad* e analisados por One-Way ANOVA - Bonferroni's multiple comparison test, e One Way ANOVA - Newman-Keuls Multiple Comparison Test, os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliações *in vitro*

5.1.1 Atividade tripanocida *in vitro*

Nos testes de inibição do parasito pelos compostos K1 e K3, foi observado que K3 apresentou uma maior capacidade de inibição quando comparado à droga de referência, o benzonidazol (Tab. 1). A inibição mais significativa foi em relação à forma tripomastigota da cepa Y, com valor de IC₅₀ de 2,19 µM. A K1 apresentou uma menor potência em relação à droga de referência, porém ainda são mais ativos quando comparados com outras moléculas, compostos ou extratos já descritos pela literatura com ação tripanocida.

Tabela 1 - Valores de inibição (IC₅₀) obtidos para os compostos K1 e K3 nas cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*.

IC ₅₀ (µM)	<i>Tripomastigotas</i> (Y)	<i>Tripomastigotas</i> (Colombiana)	<i>Epimastigotas</i> (Y)	<i>Epimastigotas</i> (Colombiana)	<i>Amastigotas</i> (Y)	<i>Amastigotas</i> (Colombiana)
Fitomenadiona (K1)	27,55 (± 0,98)	29,28 (± 4,04)	19,28 (± 0,40)	15,02 (± 0,24)	23,3 (±0,10)	33,20 (±2,78)
Menadiona (k3)	2,19 (± 0,02)	3,36 (± 0,36)	2,57 (± 0,20)	5,83 (± 2,12)	4,90 (±0,29)	7,58 (±1,59)
Benzonidazol (controle)	12,46 (± 0,52)	12,53 (± 0,55)	12,20 (± 0,82)	15,58 (±4,44)	8,66 (±0,87)	9.03 (±0,70)

Valores apresentados de média e erro padrão da média.

5.1.2 Citotoxicidade dos compostos aos esplenócitos murinos

Para o teste *in vitro* de citotoxicidade aos esplenócitos murinos foi observado que a K1 é pouco citotóxica para células de mamíferos (esplenócitos), apresentando LC₅₀ de 76,52 µM quando comparado à violeta de genciana, uma droga com efetiva ação tripanocida, porém citotóxica. Entretanto, apresenta um índice menor quando comparado à droga de referência, o benzonidazol (Tab. 2).

A K3, por sua vez, apresentou uma citotoxicidade maior em relação à K1 (LC₅₀ de 5,28 µM). Esta citotoxicidade, todavia, é menor quando comparado com a violeta de genciana. A K3 também apresentou maior citotoxicidade quando comparado à droga de referência.

Na tabela 2 também é possível visualizar o índice de seletividade para a K1 e K3 nas cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*. Os índices de seletividade para K1 e K3 foram maiores em relação à violeta de genciana. Porém, foram menores em relação à droga de referência.

Tabela 2 – Valores de citotoxicidade (LC₅₀) e índice de seletividade (IS) para os compostos K1 e K3 comparados ao controle

Drogas	LC ₅₀ (µM)	Índice de Seletividade (IS)	
		Cepa Y	Cepa Colombiana
Benzonidazol	252,04 (± 0,96)	20,22	20,11
Fitomenadiona (K1)	76,52 (± 0,22)	2,77	1,17
Menadiona (K3)	5,28 (± 0,23)	2,41	1,57
Violeta de genciana (controle)	0,26 (± 0,007)	0,10	0,53

Avaliação da citotoxicidade *in vitro* através do modelo de incorporação de [³H]-timidina. Avaliação do índice de seletividade (IS) - razão entre LC₅₀/IC₅₀ para diferentes cepas do *T. cruzi* (Para LC₅₀ apresentados os valores de média e erro padrão da média).

5.1.3 Ensaio de infecção em macrófagos

No ensaio de infecção de macrófagos foi observado que tanto as drogas K1 e K3, como a droga de referência, o benzonidazol, reduziram o percentual de macrófagos infectados em relação ao controle negativo (células não tratadas), demonstrando significância estatística na maioria dos casos.

O tratamento com K1 levou uma redução menos significante do percentual de macrófagos infectados em relação ao benzonidazol. Os valores de inibição de K1 foram apenas significativos, quando sua concentração foi aumentada em 10 vezes ou 221,8 μM (Fig. 8A e Fig. 12F).

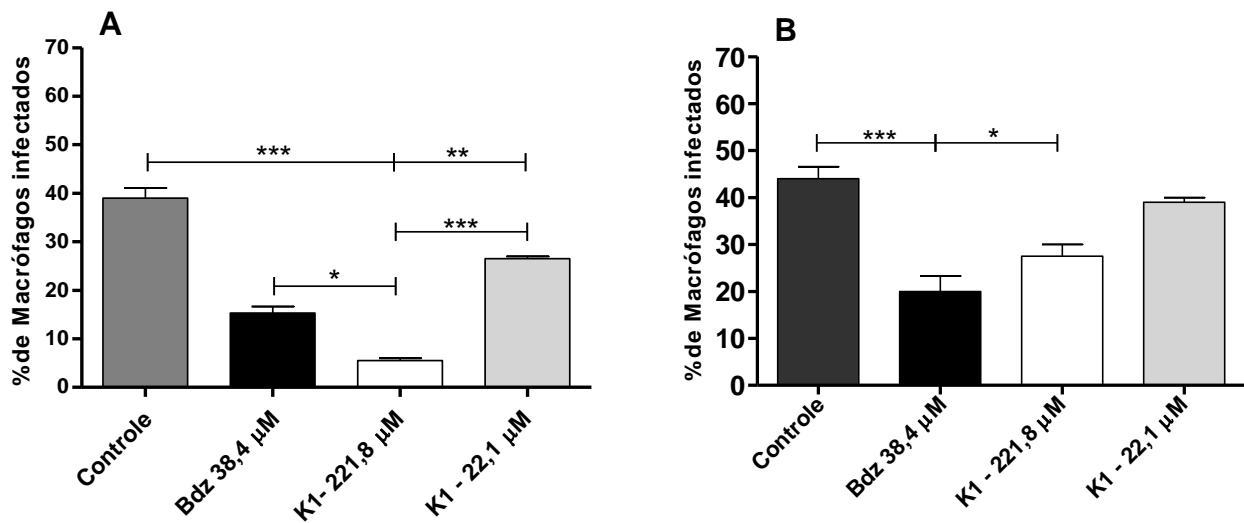


Figura 8 – Percentual de macrófagos infectados e tratados com K1 em diferentes concentrações **A.** Macrófagos infectados por *T. cruzi* de cepa Y. **B.** Macrófagos infectados por *T. cruzi* de cepa Colombiana. Benzonidazol (Bdz) - droga de referência. One-Way ANOVA - Bonferroni's multiple comparison test. $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

Foi observado uma redução do número de amastigotas por célula infectada com cepa Y após tratamento com K1 nas duas concentrações de estudo, quando comparadas ao grupo de células não tratadas (Fig. 9A e Fig. 12F). Em relação à infecção com a cepa Colombiana, contudo, a redução de células infectadas foi maior apenas em K1 na concentração de 221, 8 μ M. Na concentração de 22,1 μ M não houve inibição dos amastigotas, apresentado valores semelhantes ao grupo de células não tratadas.

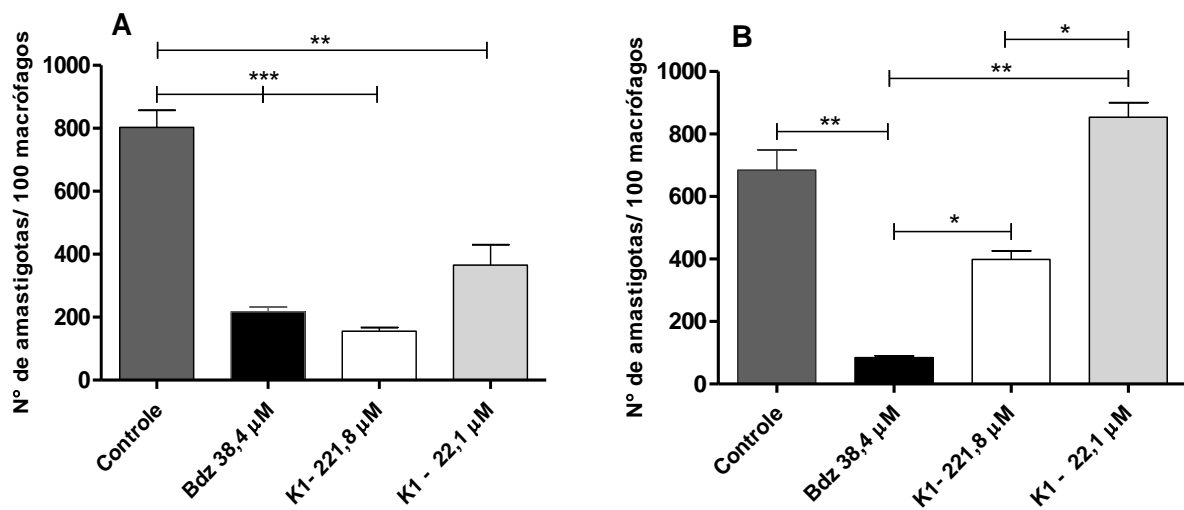


Figura 9 – Número de amastigotas/100 células tratadas com K1 em diferentes concentrações **A.** Células infectadas por *T. cruzi*, cepa Y. **B.** Células infectadas por *T. cruzi*, cepa Colombiana. benzonidazol (Bdz) - droga de referência. One-Way ANOVA - Bonferroni's multiple comparison test. $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

O tratamento com K3 na concentração de 21,4 μM promoveu uma redução no percentual de células infectadas (74,35% para cepa Y e 75,90% para cepa Colombiana) quando comparado ao grupo de células não tratadas (controle negativo). Houve uma diferença de inibição de 13,59% e 17,95% (para as cepa Y e Colombiana, respectivamente) a mais em relação ao percentual de inibição para a droga de referência (benzonidazol) em maior concentração 38,0 μM (Fig. 10 A e B). Foi observado também que o tratamento com K3 revelou uma redução do número de células infectadas proporcional a concentração, exibindo, portanto uma relação dose-dependência. Na figura 12 D e E é possível observar macrófagos tratados com K3 e uma redução do percentual de macrófagos infectados, evidenciando que a menadiona (K3) em 21,4 μM e 10 μM reduz de forma significativa a infecção *in vitro*.

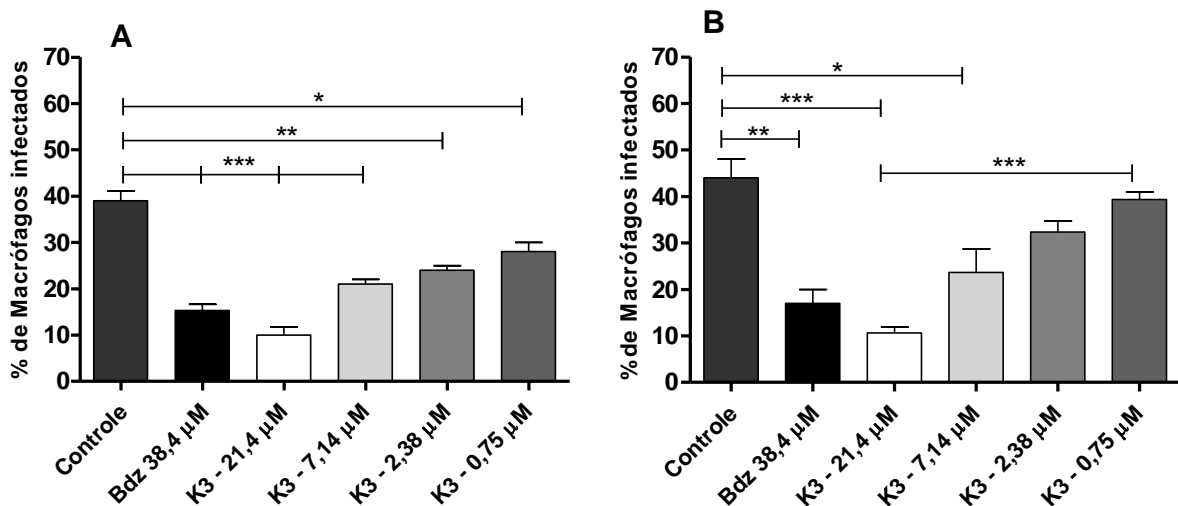


Figura 10 - Percentual de macrófagos infectados e tratados com K3 em diferentes concentrações **A**. Células infectadas por *T. cruzi* cepa Y. **B**. Células infectadas por *T. cruzi* cepa Colombiana. Benzonidazol (Bdz) - droga de referência. One-Way ANOVA - Bonferroni's multiple comparison test. $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

Foi observado uma inibição no percentual de amastigotas por célula infectada após tratamento com K3 quando avaliada em diferentes concentrações, principalmente para cepa Y. A K3 reduz o número de amastigotas mesmo em menor concentração quando comparado à droga de referência, benzonidazol, apresentando inibição evidente na concentração de 21,4 μM (Fig. 11 A e B e Fig. 12 D e E).

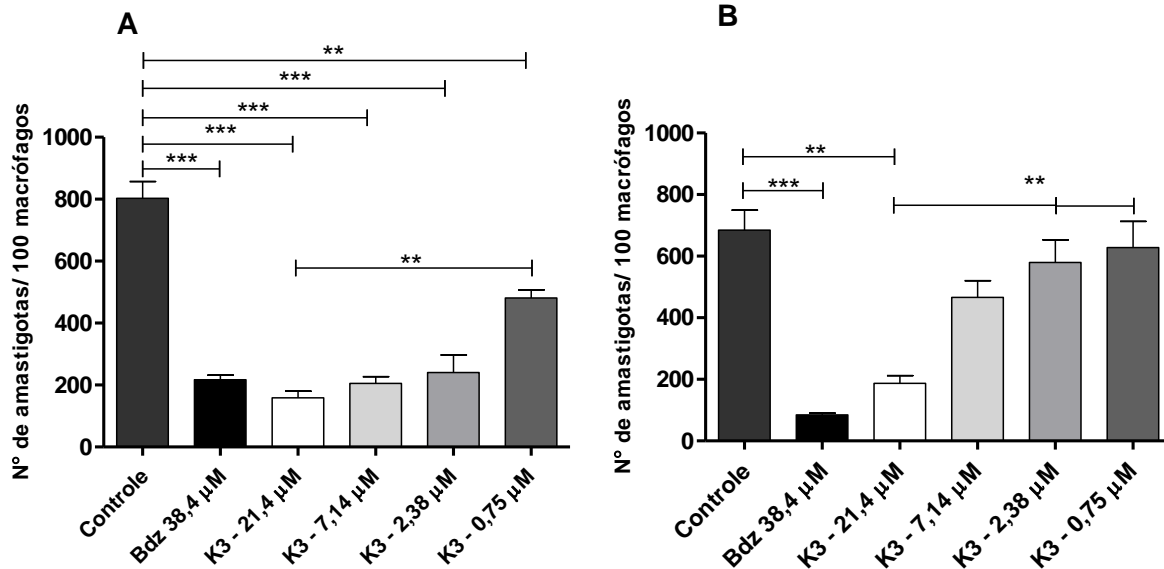


Figura 11 - Número de amastigotas/100 células tratadas com K3 em diferentes concentrações **A**. Células infectadas por *T. cruzi* em cepa Y. **B**. Células infectadas por *T. cruzi* cepa Colombiana. Benzonidazol (Bdz) - droga de referência. One-Way ANOVA - Bonferroni's multiple comparison test. $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

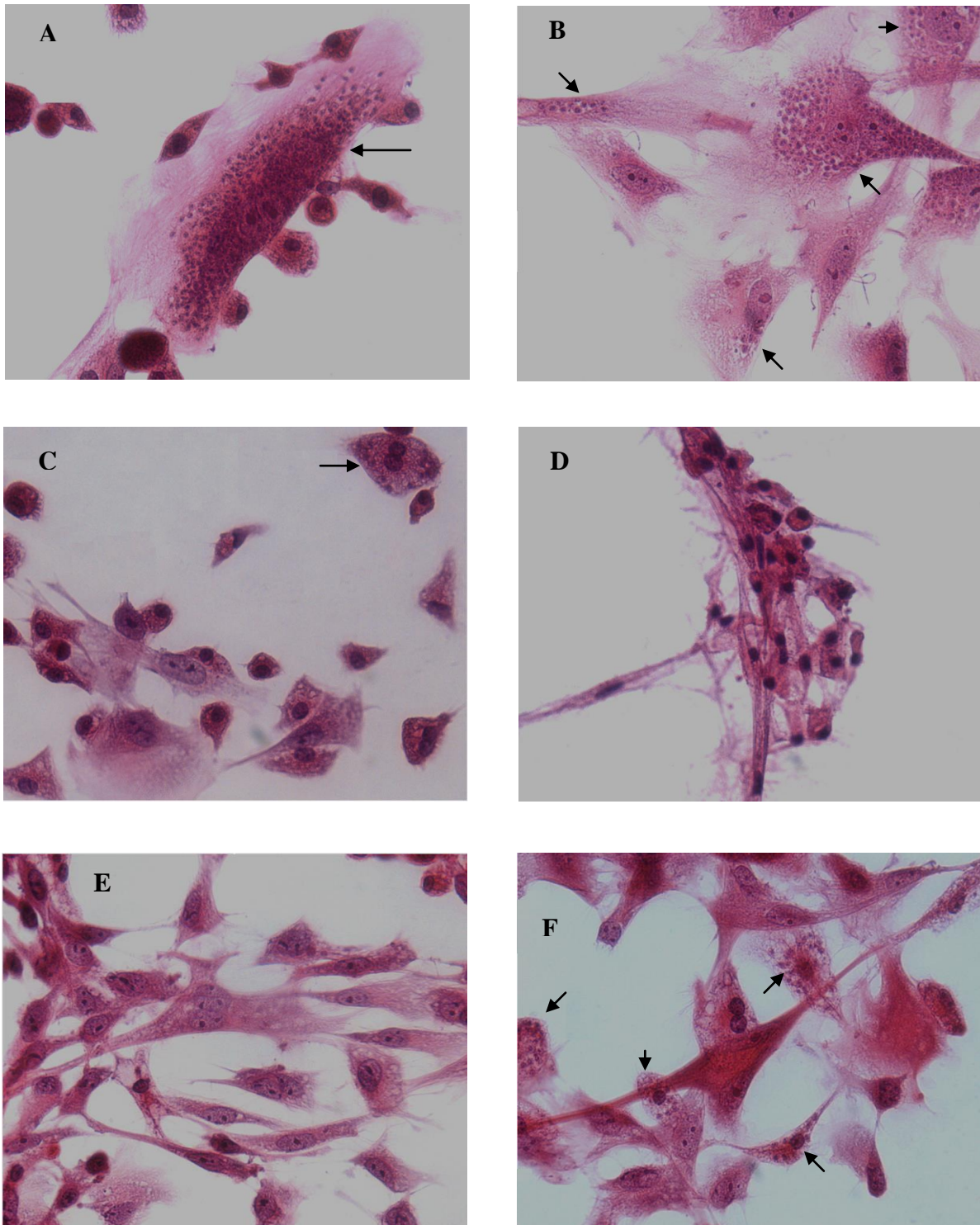


Figura 12 – Microscopia óptica de macrófagos infectados e tratados com K1 e K3. **A e B:** Controle negativo (-) macrófagos infectados (em seta) com *T. cruzi*. **C:** Controle positivo (+) tratados com Benznidazol 30,4 μM . **D:** Tratados - K3 com 21,4 μM **E:** menadiona – K3 10 μM . **F:** Tratado com fitomenadiona – K1 221,8 μM . Coloração H&E. Aumento 400X.

5.1.4 Alterações ultraestruturais

Alterações ultraestruturais foram observadas após tratamento com os compostos em teste. As Alterações mais evidentes foram observadas no tratamento com 5 μM de K3 (Fig. 13).

Dos parasitos tratados com K3 na concentração do IC_{50} , cerca de 60% estavam alterados e estas alterações atingiram cerca de 80% dos parasitos quando tratados na concentração de 5 μM (Fig. 13). Dentre as alterações observadas em MEV destacam-se: protruções e descontinuidade na superfície da membrana (Fig. 14 D e E), encolhimento e distorção (Fig. 14 F).

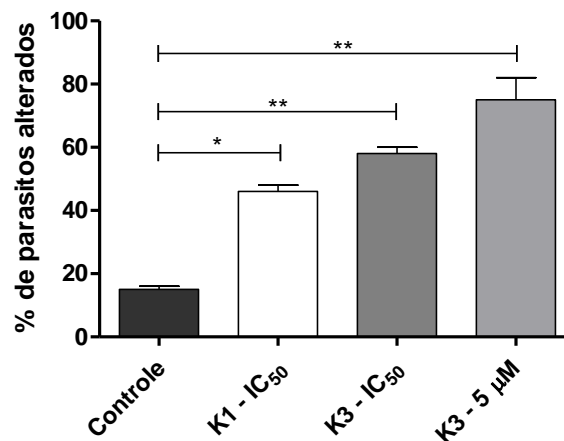


Figura 13 – Quantificação das alterações ultraestruturais após tratamento *T. cruzi* - cepa Colombiana com K1 e K3 por MEV. Controle – parasitos não tratados. K1 – IC_{50} : Parasitos tratados com fitomenadiona na concentração de IC_{50} para cepa Colombiana (29,28 μM). K3: IC_{50} : 3,36 μM e K3: 5 μM . One-Way ANOVA - Bonferroni's multiple comparison test. $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

Os parasitos incubados com K3 nas concentrações de IC_{50} e de 5 μM apresentaram outras alterações também observadas a MET, como: separação das membranas nucleares e alteração de retículo (Fig. 15 B), protruções, desestruturação da membrana plasmática (Fig. 15 F), com evidências de extração do citoplasma (Fig. 15 E e G). As alterações mais evidentes foram intumescimento do cinetoplasto (Fig. 15 C e E) e desestruturação mitocondrial (Fig. 15 E e G), bem como, presença de corpos vacuolares no citoplasma (Fig. 15 D).

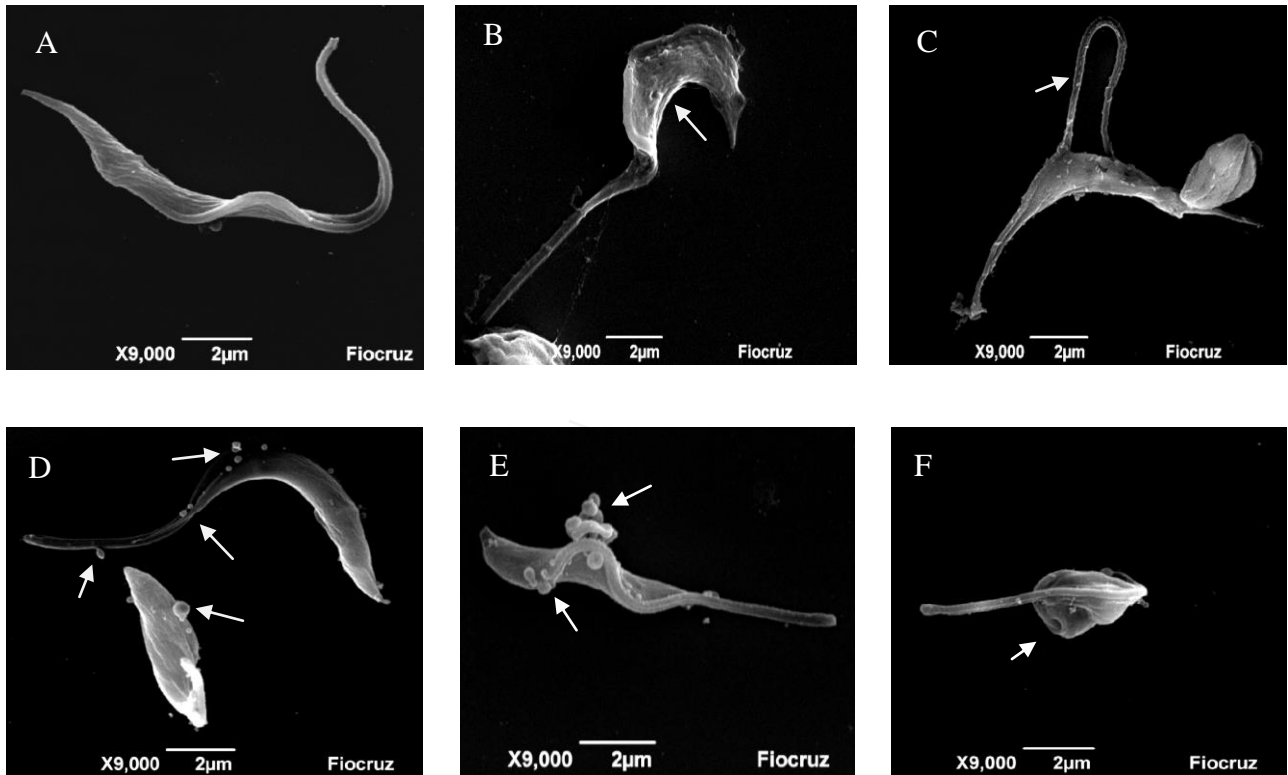


Figura 14 - Alterações ultraestruturais observadas através de MEV. *T. cruzi* na cepa Colombiana tratados com K1 e K3. **A:** Controle Negativo – parasito não tratado (tripomastigota); **B:** Parasito tratado com K1 em IC_{50} - alterações em membrana; **C:** K3 em IC_{50} - descontinuidade de membrana, “desmembramento” de estrutura paraflagelar – formato de alça de bolsa; **D:** K3 em $5 \mu M$ – Protrusão (amastigota e tripomastigota); **E:** K3 em $5 \mu M$ - protrusão e descontinuidade de membrana. **F:** menadiona $5 \mu M$ – encolhimento.

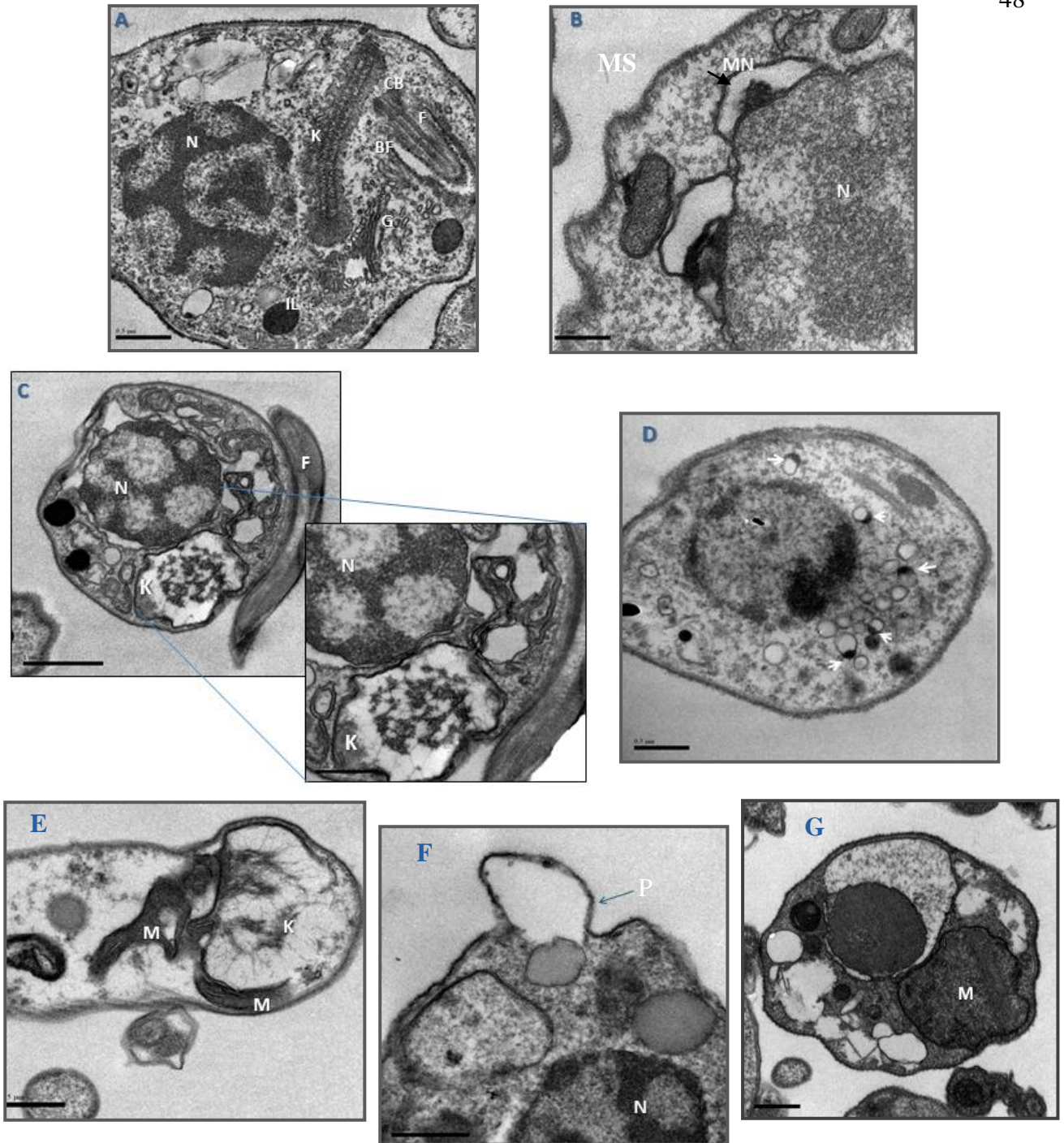


Figura 15 - Alterações ultraestruturais observadas ao MET. **A:** Parasito controle evidenciando as organelas. **B:** Presença de abertura na membrana nuclear (MN), alteração de retículo tratado com K3 IC₅₀. **C:** Degeneração do cinetoplasto, alterações de membrana sugerindo estruturas autofágicas, formação de autofagossomas tratado com K3 IC₅₀. **D:** Presença de numerosos vacúolos – tratados K3 IC₅₀. **E:** Tumefação do cinetoplasto e desestruturação mitocondrial – tratados com K1 IC₅₀. **F:** Formação de protrusão e extravasamento de membrana. Trat. K1 IC₅₀. **G:** Extração do citoplasma e tumefação mitocondrial, com evidente degeneração celular Trat. K3 5 μM. (N-núcleo; M-mitocôndria; MN-membrana nuclear; K-cinetoplasto; G-complexo de golgi; IL-inclusões lipídicas; F-flagelo; BF-bolsa flagelar; CB-corpúsculo basal; MS-microtúbulos subpelviculares; p-protrusão).

5.2 Avaliações *in vivo*

Após tratamento com K1, foi possível observar uma parasitemia mais intensa do que o grupo infectado não tratado (veículo) e controle positivo (benzonidazol), porém, com o resultado estatisticamente significativo apenas no 30º e 33º dias pós-infecção em relação ao grupo controle negativo (Fig. 16).

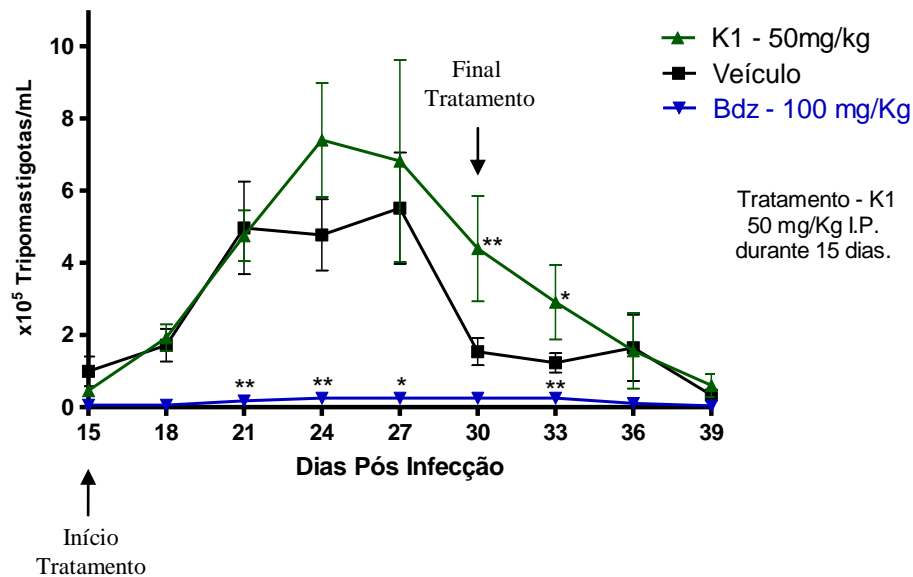


Figura 16 – Curva de parasitemia – Trat. com K1. One Way ANOVA - Newman-Keuls Multiple Comparison Test . $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

A curva de sobrevivência demonstrou uma maior mortalidade do grupo tratado com K1 em relação aos controles (Fig. 17).

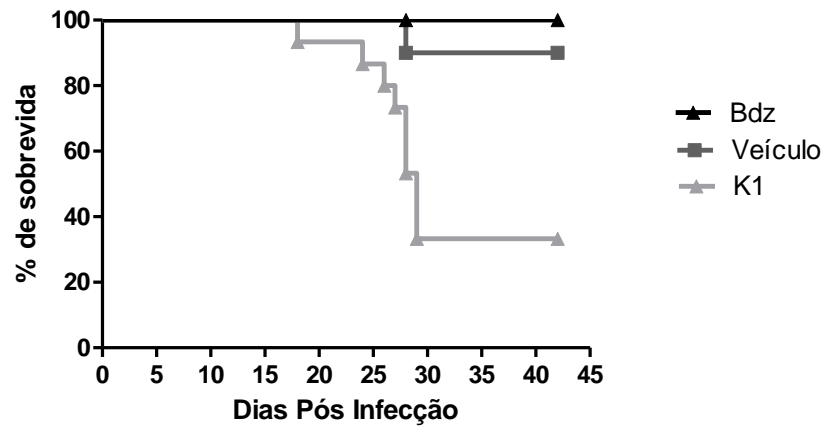


Figura 17 - Curva de sobrevivência – Trat. K1 em C57BL/6. Infectados com *T. cruzi* - cepa Colombiana.

No grupo tratado com K3, no entanto, foi possível observar uma redução na parasitemia, mais significativa a partir do 8º dia pós-infecção como observado na figura 18. Não houve diferença de mortalidade em relação aos grupos (dado não mostrado).

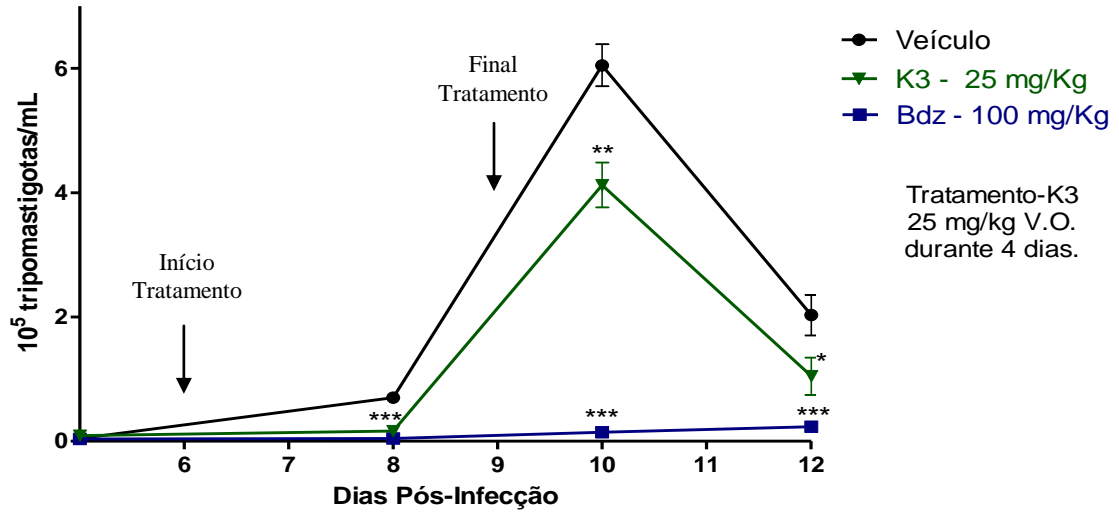


Figura 18 – Curva de parasitemia – Trat. K3. Não foi observado aumento da sobrevivência do grupo tratado em relação ao controle (dado não mostrado). One Way ANOVA - Newman-Keuls Multiple Comparison Test $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

6 DISCUSSÃO

Alternativas terapêuticas que visam uma eficaz atuação tripanocida são caracterizadas como uma importante ferramenta, não só no tratamento da fase aguda, mas também na redução das manifestações crônicas da doença de Chagas. Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar a atividade terapêutica dos derivados de vitamina K.

Foi avaliada a capacidade de inibição de diferentes formas do *T. cruzi*, bem como sua viabilidade e proliferação com o uso destes compostos (K1 e K3) sobre diferentes cepas. Para tal, os experimentos foram realizados com as cepas Colombiana e Y.

A escolha destas cepas foi baseada em análise de literatura por diferentes estudos. Alguns autores afirmam que a maior resistência de algumas cepas como a colombiana, deve ocorrer devido às características presentes na estrutura da membrana plasmática, por apresentarem uma família de proteínas de superfície celular como as mucinas transialidades (TODESCHINI, *et al*, 2009; BORGES *et al* 2009).

Martinez-Dias e colaboradores (2001), por outro lado, afirmam que a cepa Y é uma boa indicadora para a triagem primária de novos agentes tripanocidas, uma vez que apresenta uma virulência menor em relação a outras cepas e biodemas do parasito, viabilizando, com isso, a segurança e utilização em experimentação.

Para a avaliação da inibição de viabilidade de *T. cruzi*, foi calculado o IC₅₀ para os respectivos compostos, nas diferentes cepas e formas do parasito (Tab. 1). O parâmetro (IC₅₀) representa a potência de uma droga, ou seja, a concentração capaz de inibir 50% de parasitos em determinado meio. Isto se traduz em uma maior atividade de uma substância quanto menor sua concentração capaz de inibir ou matar um parasito, exercendo, portanto, uma ação tripanocida.

Nos testes de inibição do crescimento e proliferação do parasito por K1 e K3 foi observado maior efeito da K3 quando comparada à droga de referência, o benzonidazol, ou seja, um menor índice IC₅₀ em relação à droga de referência em ambas as cepas e em diferentes formas do *T. cruzi* (Tab. 1). Estes resultados, portanto, corroboram com dados de Kubata e colaboradores (2002), onde afirmam que derivados

de naftoquinonas exercem uma importante ação tripanocida através da geração de radicais livres, promovendo uma degeneração do parasito.

De acordo com Da Silva e colaboradores (2008), outros derivados de naftoquinonas tais como: 1,2,3 derivados triazol de β -Lapachol também apresentaram um potencial inibitório, com IC₅₀ de 17,3 (\pm 2.0) μ M para formas tripomastigotas do *T. cruzi* em cepa Y, enquanto a K3 testada neste estudo, apresentou um melhor resultado para esta mesma cepa e forma do parasito, com índice de IC₅₀ de 2,19 (\pm 0,02) μ M (Tab. 1).

A K1 apresentou um menor potencial inibitório do *T. cruzi* em relação à droga de referência. Entretanto, seus valores ainda são importantes quando comparados aos compostos de ação tripanocida, tais como, o extrato metanólico da casca do caule de *C. cajucara* (MCC), aos terpenos isolados de ácido acetil aleuritolic (AAA) e trans-desidrocrotonina (t-doença de ChagasTN), que apresentam IC₅₀ respectivamente de: 49,56 (\pm 5,6); 598,6 (\pm 80,9); e 187,2 (\pm 18,1) μ g/mL para formas tripomastigotas da cepa Y (CAMPOS *et al*, 2010). O resultado do presente estudo, para a mesma forma e cepa do parasito demonstrou valores de 12,42 \pm 0,4450 μ g/mL para K1 e 0,3772 \pm 0,0046 μ g/mL para K3 (respectivamente valores de: 27,55 \pm 0,98 e 2,19 \pm 0,02 μ M) (Tab. 1).

Os valores de IC₅₀ obtidos neste estudo para K1 e K3 também foram mais significativos quando comparados com outras substâncias e moléculas com ação tripanocida descritas na literatura. Em estudo desenvolvido por Cabarello e colaboradores (2011), a molécula 5-metil-1,2,4-triazol [1,5-a] pirimidina-7(4H) ou (HmtpO) e HmtpO ligado à metal apresentou IC₅₀ de 49,0 μ M e 27,3 a 31,2 μ M respectivamente, para formas epimastigotas do *T. cruzi* de linhagem *Maracay* (Venezuela). No presente estudo foram obtidos valores que oscilam de 2,57 a 5,83 μ M para K3 e 19,28 a 15,02 para K1 para a forma epimastigota do *T. cruzi* nas cepas Y e Colombiana respectivamente (Tab. 1), confirmando, portanto, a significância dos resultados obtidos.

Corroborando com estes resultados das vitaminas K1 e K3, que apresentam em sua constituição molecular, a estrutura de naftoquinona, Salas e colaboradores (2008), também demonstraram que as naftoquinonas naturais como o *Lapachol* e β -Lapachone

apresentaram efetiva ação tripanocida.

As naftoquinonas, por serem lipofílicas devido a presença de grupo metoxila e cadeias alifáticas, possibilitam uma melhor penetração através da membrana plasmática do parasito (K. C. G. DE MOURA, 2008, *apud* CASTRO, 2011), o que pode ter contribuído para o efeito sobre o *T. cruzi*.

Diversos estudos na literatura apontam que derivados de naftoquinonas podem atuar como inibidores da TR (SALMON-CHEMIN, 2000; CASTRO e TOMÁS, 2008; CASTRO *et al*, 2011). A análise do efeito tripanocida dos compostos pode ser corroborada por uma possível similaridade estrutural de K1 e K3 para o mesmo ligante da TR, como demonstrado segundo banco de dados de moléculas (KEISER, 2007), disponível no site do SEA (<http://sea.bkslab.org/search/>). Este dado sugere um possível mecanismo de ação da K1 e K3 sobre ligantes da TR do *T. cruzi*.

Caricchio e colaboradores (1999), também sugeriram que um dos possíveis mecanismos de ação da K3 poderia ocorrer através da indução do estresse oxidativo, levando à apoptose por um provável mecanismo de ativação do Fas/Fas ligante. A K3 leva à uma ativação do ciclo redox e a geração de intermediários reativos do oxigênio, causando um dano oxidativo. Além disso, intermediários reativos do oxigênio podem ativar o NF- κ B, um importante fator de transcrição nuclear, promovendo a transcrição de genes associados à proteínas envolvidas na morte celular (CARICCHIO *et al*, 1999).

Em outra etapa deste estudo foi realizado o ensaio de citotoxicidade, no qual foi demonstrada uma maior ação citotóxica da K3 em relação à K1 (Tab. 2). Desta forma, futuros estudos podem sugerir alterações estruturais e moleculares da K3 com o objetivo de reduzir a sua citotoxicidade, potencializando, assim, seu efeito tripanocida *in vitro*.

Contraopondo com estes dados, estudos realizados por Checker e colaboradores (2011), demonstraram que a K3 parece não induzir citotoxicidade em linfócitos não estimulados em concentrações de até 10 μ M, neste mesmo estudo, a K3 não induziu morte celular dos linfócitos.

Os compostos K1 e K3 apresentaram maior citotoxicidade quando comparado a outros compostos com ação tripanocidas, descritos em literatura. Em estudo de Bacerra e colaboradores (2012), o composto N-benzenesulfonylbenzotriazole (BSBZT),

apresentou LC₅₀ de 28.40 µg/mL (106.79 µM) enquanto que o LC₅₀ para K1 e K3 foram respectivamente: 76,52 e 5,28 µM (Tab. 2). Contudo, no presente estudo, quando foi comparado com o IC₅₀ do composto BSBZT, observou-se que a K1 e K3 apresentaram valores mais significativos de inibição das diferentes formas do *T. cruzi*.

Para epimastigotas em período de incubação de 72h, o composto descrito (BSBZT), apresentou IC₅₀ de 21.56µg/mL (81.07µM). Os índices de K3, no entanto, obtido neste estudo para formas epimastigotas incubadas em 24 foram de 2,57 µM para cepa Y e 5,83 µM para Colombiana, o que demonstra uma maior a potência do composto K3.

A partir dos dados de IC₅₀ e citotoxicidade (LC₅₀), é possível determinar a seletividade de uma droga, uma vez que esta seletividade pode ser calculada entre a razão da LC₅₀ pela IC₅₀. O índice de seletividade (IS) ideal para uma droga teste deve ser acima de 3 (IS>3) (PRAYONG *et al*, 2008). Nos resultados deste estudo foi possível obter índices variáveis em torno de 1,17 a 2,77 (Tab. 2). Uma possível redução da citotoxicidade da K3 poderia elevar o índice de seletividade, aumentando assim, o potencial efeito tripanocida.

Diversas pesquisas de drogas com ação tripanocida utilizam o modelo de infecção de macrófagos, com o objetivo de avaliar a eficácia de certas drogas na inibição da infecção pelas formas tripomastigotas e da proliferação de formas amastigotas do *T. cruzi*, com o intuito de determinar a atuação de uma droga sobre diferentes formas do parasito presente no hospedeiro definitivo (BOUTALEB-CHARKI, 2009).

No presente estudo foi possível evidenciar que a K3, em concentração de 21,4 µM, reduziu de forma mais significativa o número de macrófagos infectados, bem como o número de amastigotas por célula do que o benzonidazol, em maior concentração (38,4 µM).

A K3, também apresentou um índice de inibição de formas amastigotas de 4,90 a 7,58 µM. A curva da relação tratamento K3 *versus* número de macrófagos infectados e amastigotas por macrófago apresentou-se de forma concentração-dependente, ou seja, em maior concentração, há um maior percentual de inibição de células infectadas. Este resultado corrobora com trabalho apresentado por Castro e colaboradores (2011),

demonstrando que o tratamento de macrófagos murinos infectados e tratados com derivados de naftoquinonas, também ocasiona uma redução de forma concentração-dependente no percentual de infecção *in vitro*.

Alguns autores demonstraram também que a inibição do parasito pelas naftoquinonas como a β -lapachona pode estar associada a possíveis alterações ultraestruturais ocasionadas no parasito, devido ao aumento da formação de peróxido de hidrogênio, o que resulta em uma maior susceptibilidade à ação das drogas sobre organelas, como as mitocôndrias (CASTRO, 2011).

Segundo Vannier-Santos e colaboradores (2009), a microscopia eletrônica permite indicar os compartimentos intracelulares alterados, mecanismos, vias de interação metabólicas e alvos presumíveis bem como os efeitos tóxicos gerais na atuação de uma droga.

Neste trabalho foi evidenciada, em tripomastigotas tratados, uma frequência alta de células com cinetoplastos alterados, apresentando um característico intumescimento, assim como foi observado por Menna-Barreto e colaboradores (2007), em estudo de outros compostos com ação tripanocida. Outras alterações também foram evidenciadas como: presença de bolhas na membrana plasmática, bem como fragmentação do cDNA.

Segundo Menna-Barreto e colaboradores (2007), derivados de naftoquinonas ocasionam geralmente um inchaço na mitocôndria do parasito, o que também foi evidenciado neste estudo. Danos morfológicos induzidos podem ser evidentes em mitocôndria, complexo de golgi e reservossomos (MENNA-BARRETO, *et al*, 2005).

Análises ultraestruturais deste estudo também revelaram a presença de um intumescimento mitocondrial, protrusões na membrana, presença de estruturas semelhantes à autofagossomos e figuras de mielina, o que pode indicar uma associação e formação de vários mecanismos de lesão no parasito tratado, resultando em mecanismo de morte celular (VANNIER-SANTOS, *et al*, 2009).

Outros trabalhos descritos relatam mecanismos semelhantes de atuação de outras naftoquinonas sobre o cinetoplasto. Neste trabalho, observou-se um intumescimento do cinetoplasto. Dados da literatura sugerem mecanismos associados ao estresse oxidativo gerado por um possível bloqueio da ação da TR. Contudo, o

presente estudo ainda necessitaria de ensaios enzimáticos sobre a TR para comprovar este mecanismo de ação (MENNA-BARRETO, *et al*, 2005; VANNIER-SANTOS, *et al*, 2009).

Soeiro e colaboradores (2011), afirmam que a inibição do succinato citocromo c, seria um dos mecanismos responsáveis por bloquear o ciclo celular, inibindo e induzindo o dano em organelas como: mitocôndria, reservossomos e complexo de Golgi para formas epimastigotas do *T. cruzi*. Menna-Barreto e colaboradores (2007), também afirmam que derivados de naftoquinonas como a β -lapachona, podem ocasionar alterações nestas mesmas organelas do parasito.

Segundo Vannier-Santos e colaboradores 2009, células submetidas a um estresse oxidativo, resultam em um mau funcionamento mitocondrial, ocasionando uma maior produção de radicais intermediários de oxigênio e ativando a eliminação de organelas por autofagia. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio pode alterar e comprometer as organelas do parasito, dentre elas, a mitocôndria, ocasionando um intumescimento. A morte celular, por sua vez, pode estar relacionada à ativação de proteínas quinases associadas (DAPk), inferindo que diferentes mecanismos de morte podem ser ativados simultaneamente (VANNIER –SANTOS, *et al*, 2009).

Estes dados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, no qual o estresse oxidativo seria o principal mecanismo de atuação da K1 e K3, induzindo uma degeneração do parasito principalmente por alterações no cinetoplasto.

A descontinuidade da membrana plasmática observada na avaliação por MEV, também pode ser indicativo de lesão por estresse oxidativo. Alterações em membrana plasmática do parasito também podem ser evidentes, como contorção do citoplasma e corpo celular, o que resulta em um encolhimento celular devido a uma possível desestruturação dos microtúbulos subpeliculares, sugerindo também, a perda citoplasmática ou a desorganização do citoesqueleto. Foi observado também a condensação da cromatina do núcleo, o que segundo VANNIER-SANTOS e colaboradores (2009), pode ocorrer devido à inibição da topoisomerase II.

É possível perceber que as lesões ao nível celular podem ser resultados de diversos estímulos. Estes estudos morfológicos demonstram uma necessidade de investigações bioquímicas, enzimáticas ou/e imunológicas e mecanismos de sinalização

mais aprofundadas no intuito de ratificar estas alterações observadas em nível ultraestrutural.

Para confirmar as possíveis alterações *in vitro* ocasionadas no parasito pelos compostos testados, foi avaliado o efeito das drogas em modelos experimentais.

Para a avaliação do experimento *in vivo* com a K1, foi proposto uma dose de 50 mg/kg IP (OGAWA *et al*, 2007) durante 15 dia, o que acarretou um evidente aumento na parasitemia, mais significativo entre o 30º e 33º dias pós-infecção (Fig. 16) e maior mortalidade do grupo tratado (Fig. 17).

Sabe-se que K1 é substância segura. Segundo dados de literatura (GOODMAN E GILMAN'S, 2001; IARC MONOGRAPHS - VITAMIN K, 2010), não é considerada tóxica em animais e é utilizada como fármaco pró-coagulante no tratamento clínico, inclusive em pacientes pediátricos. Dados publicados no PubMed *Pubchemical* (NCBI – Pub chem Compound, 2011), descreveram uma dose letal (LD₅₀) para a K1 em camundongos de 25.000 mg/Kg V.O. e 6.570 mg/Kg IP. Considera-se a LD₅₀ como dose letal mediana de uma droga, ou dose letal para 50% da população testada. Quanto maior a dose letal, menos tóxica é esta droga (VON ARDENNE, 1967).

Desta forma, a dose de 50 mg/Kg utilizada neste experimento é inferior a dose letal descrita por ensaios em literatura, o que sugere então que a dose não foi responsável pela alta mortalidade.

Possivelmente, outros mecanismos, como talvez a imunossupressão, estariam envolvidos nesta alta parasitemia observada no experimento com K1, dados que favorecem a necessidade de estudos complementares posteriores.

Soeiro e colaboradores (2011), afirmam que nem sempre há uma correlação direta entre o efeito *in vitro* e os efeitos clinicamente relevantes em estudos experimentais *in vivo*. A atividade de uma droga no organismo pode sofrer influência de enzimas ou mecanismos de primeira passagem hepática, bem como sua bio-transformação como um pró-fármaco, ou seja, exercer sua atuação efetiva apenas quando interage com o sistema biológico (GOODMAN e GILMAN'S, 2001). Portanto, apesar dos testes de inibição do parasito *in vitro* serem promissores, outros mecanismos podem estar envolvidos na atuação *in vivo*.

No que se refere ao experimento com a K3, foi proposto uma dose mais

reduzida, devido sua citotoxicidade. Os ensaios *in vivo* foram realizados a fim de investigar o potencial tripanocida como demonstrado *in vitro*. Percebeu-se que houve uma redução na parasitemia durante o tratamento destes animais infectados (Fig. 18), sem ocorrência de diferença de mortalidade entre os grupos. Para a K3, a literatura descreve que o LD₅₀ é de 500 mg/kg (PubMed- ChemIDplus Advanced, 2011), portanto, foi utilizada uma dose abaixo da dose letal, com 25 mg/kg por 4 dias, em uma dose total de 100 mg/kg. Não foi evidenciado possíveis sinais de toxicidade nos animais tratados em fase aguda com K3.

É possível perceber, portanto, que a formulação e a busca de quimioterápicos tripanocidas são bastante complexas, seus mecanismos ocorrem não só por ação direta da droga no parasito, mas também a suas possíveis interações no organismo *in vivo*. Neste contexto, as perspectivas futuras para os ensaios de drogas com ação tripanocida apontam para a associação de terapias combinadas, com o objetivo de associar diferentes compostos que atuam sobre alvos distintos do *T. cruzi*.

Percebe-se que o potencial tripanocida da vitamina K pode ser potencializado propondo-se alterações destes compostos com o objetivo de propor aprimoramentos estruturais moleculares para reduzir a citotoxicidade e potencializar a ação da K1 e K3. Ensaios futuros deste estudo pretende avaliar e desenvolver curva concentração-resposta para K3, bem como avaliação de ensaios toxicológicos.

Estes estudos confirmam a necessidade de pesquisas constantes na busca de uma quimioterapia tripanocida eficaz, sem, ou com efeitos colaterais toleráveis. Os derivados de naftoquinonas, dentre eles, as vitaminas K, apresentam-se como uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos tratamentos da doença de Chagas. Busca-se um aprimoramento contínuo para a melhor eficácia destes compostos, com o objetivo de promover alternativas de tratamento na fase aguda, ou evitar a progressão para a forma sintomática da fase crônica na doença de Chagas, em geral, debilitante e de curso fatal.

Os resultados demonstram o efeito anti-*T. cruzi* das moléculas testadas e sugerem que estas possam servir de base para o desenho de novos compostos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo é possível inferir que:

- ✓ Dentre as formas de vitamina K testadas, K3 apresentou a melhor concentração inibitória (IC₅₀ de 2,19 µM) para formas tripomastigotas em cepa Y em relação à droga de referência, o benzonidazol.
- ✓ Na avaliação da citotoxicidade, a K3 apresentou-se maior potencial citotóxico, em relação à K1.
- ✓ Foi observado que, apesar da citotoxicidade apresentada a K3, há uma maior seletividade do compostos ao parasito do que à célula de mamífero, porque os valores de inibição (IC₅₀) para as formas tripomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi*, são menores do que a citotoxicidade (LC₅₀). Os índices de seletividade, portanto, são maiores que 1.
- ✓ Dentre as duas formas de vitamina K avaliadas, a K3, foi a que demonstrou melhor efeito tripanocida tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*.
- ✓ K1 exerceu baixo efeito tripanocida *in vitro* e não reduziu a parasitemia em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, MJM. Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. **Bras. J. Med Biol Res**, v. 29, n. 7, p. 831-833, 1996.
- ALVES, MJ; W, Colli. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. **Subcell Biochem**. v. 47, p. 58–69, 2008.
- ANDRADE SG. *Trypanosoma cruzi*: Estrutura clonal de linhagens do parasita e da importância de clones principais . **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 94. Supl. 1. p. 185-187, 1999.
- ANDRADE ZA. Fisiopatogenia da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**. v. 29 (supl.), p. 131- 140, 2000.
- ARAKAKI, Tracy L. *et al.* Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol Microbiol**. v. 68, n. 1, p. 37-50, 2008.
- ASHBURN, Ted T; Thor, Karl B. Drug Repositioning: Identifying And Developing New Uses For Existing Drugs. **Nature Reviews - Drug Discovery**. v. 3, p. 673-683, 2004.
- BACERRA, M.C; Guiñazú N; Hergert L.Y, Pellegrini A, Mazzieri M.R, Gea S, Albesa I. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Exp. Parasitol**. v. 131, n. 1, p. 57-62, 2012.
- BARBOSA, Luciana G. N. Doença de Chagas- 1909-2009 – Artigo de Revisão. **Logos**, n. 17, 2009.
- BARRIAS, E.S; Reignault L.C; DE SOUZA, Wanderley; Carvalho, TM. Dynasore a Dynamine Inhibitor *Trypanosoma cruzi* entry into Peritoneal Macrophages. **PLSO ONE**. v. 5, n. 1, jan, 2010.
- BORGES, Claudia, R.B; Rodrigues Júnior V. Papel do óxido nítrico no

desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 2, p.170-174, mar-abr, 2009.

- BOUTALEB-CHARKI, Samira; Marin, Clotilde; Rosales, Maria J. Copper (II) Complexes of [1,2,4] Triazolo [1,5-a] Pyrimidine Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents. **Drug Metabolism Letters**. v. 3, p. 35-44, 2009.
- BREEN, G.A; St Peter, W.L. Hypoprothombinemia associated with cefmetazole. **Ann. Pharmacother**. v. 31, p. 180–184, 1997.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosome cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v. 4, p. 389-396, 1962.
- BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A; BARRAL-NETTO, Manoel. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- BOSCARDIN, Silvia B; Sheila S. Kinoshita, Adriana E. Fujimura; Mauricio M. Rodrigues. Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experimental Infection. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 5, p. 2744–2757, Mai, 2003.
- CABARELLO, Ana B; Marin, C. Rodríguez-Diéíguez, A. *et al.* In vitro and in vivo antiparasital activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo [1,5- a] pyrimidin-7(4 H)-one-based complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 105, p. 770– 776, 2011.
- CAMPOS, M. C; Salomão, K; Castro-Pinto, D. B. *et al.* Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**. v. 107, n. 5, p. 1193-1204, 2010.
- CANÇADO JR. **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte. Fundação Carlos Chagas, 1985.

- CARICCHIO, R; Kovalenko D , Kaufmann WK , Cohen PL Apoptose provocada pelo estresse oxidativo indutor menadiona (vitamina K (3)) é mediada pelo sistema ligante Fas / Fas. **Clin Immunol.** v. 93, n.1, p. 65-74, 1999.
- CARDILLO, Fabíola; Postol E; Nihei J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8⁺ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. **Immunology.** v. 122, n. 4, p. 584-595, 2007.
- CARVALHO, Antonio C. Campos de; GOLDENBERG, Regina C. S; JELICKS, Linda A. *et al.* Cell Therapy in Chagas Disease - Review Article. **Interdiscip Perspect on Infect Dis.** Epub 2009 Jun 11. 2009.
- CASTRO, Solange L. de; BATISTA, Denise G. J; BATISTA, Wanderson; DALIRY, Anissa *et al.* Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential Trypanosoma cruzi Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology International.** Epub 2011 Jun 30, 2011.
- CASTRO H, Tomás AM. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxid Redox Signal.** v. 10, n. 9, p. 593-606, 2008.
- CHECKER, R; Sharma D; Sandur, S. K; *et al.* Vitamin K3 suppressed inflammatory and immune responses in a redox-dependent manner. **Free Radic Res.** v. 45, n. 8, p. 975-985, 2011.
- CUNHA-NETO, E; Coelho,V; Guilherme,L; Fiorelli,A; Stolf,N; e Kalil,J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein cross reactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J.Clin.Invest.** v. 98, p.1709-1712, 1998.
- DE SOUZA, Wanderley; CARVALHO, Tecia Maria U; BARRIAS, Emile S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology.** 18 p, 2010.
- DIAS-LIMA, Artur, L; Sherlock, Ítalo A. Sylvatic Vectors Invading Houses and the Risk of Emergence of Cases of Chagas Disease in Salvador, State of Bahia,

Northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n.5, p. 611-613, Sep/Oct, 2000.

- DIAS, Luiz C; Dessoy, Marco A; Silva, Jean J. N. *et al.* Quimioterapia Da Doença de Chagas: Estado Da Arte E Perspectivas No Desenvolvimento De Novos Fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, 2009.
- DIAS, J.C.P; COURA J.R: Epidemiologia. In: **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma Abordagem Prática para o Clínico**. DIAS e COURA JCP, Coura JR (Eds). Fiocruz Publisher, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
- DHIMAN, Monisha; *et al.* Enhanced Nitrosative Stress during *Trypanosoma cruzi* Infection Causes Nitrotyrosine Modification of Host Proteins. *Implications in Chagas' Disease*. Immunopathology and Infectious Disease. **The American Journal of Pathology**. v. 173, n. 3, 2008.
- DA SILVA Jr, R. F. S. Menna-Barreto, M. D. C. F. R. Pinto *et al.* Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1774–1780, 2008.
- ENGEL, Juan C; Doyle, Patricia S. *et al.* Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**. v. 111, p. 597-606, 1998.
- EBERLE C, Lauber BS, Fankhauser D; *et al.* Improved inhibitors of trypanothione reductase by combination of motifs: synthesis, inhibitory potency, binding mode, and antiprotozoal activities. **Chem Med**. v. 6, n. 2. p. 292-301, 2011.
- FAIRLAMB, A. H; Blackburn P; Ulrich P; Chait B.T; Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**. v. 227, n. 4693, p. 1485-7, 1985.
- FAIRLAMB, A. H; Future prospects for the chemotherapy of Chagas' disease. **Medicina (B Aires)**; v. 59 Suppl, p.179-87, 1999.

- FIGUEREDO, R. C; Norton R. C; *et al.* Late hemorrhagic disease of the newborn: case report **J Pediatr.** v. 74, n.1, p. 67-70, Jan-Feb 1998.
- FIOCRUZ. **Doença de Chagas.** Fonte web-site: <http://www.fiocruz.br/chagas>. Acesso: 12-04-2011.
- FURIE, B. C. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. **Blood.** v. 75, p. 1753-1762, 1990.
- GARCIA, Simone; Ramos, Carolina; Senra, Juliana F. V; Soares, Milena B. P. *et al.* Treatment with Benzonidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.
- GAST GC; de Roos NM; Sluijs I; *et al.* A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v. 19, n.7, p. 504-10, sep, 2009.
- GELEIJNSE JM; Vermeer C; Grobbee DE; Schurgers LJ; Knapen MH; van der Meer IM; Hofman A; Witteman JC. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. **J Nutr;** v. 134, n. 11, p. 3100-5, nov, 2004.
- GIRAUIT, Sophie; DAVIOUD-CHARVET, Elisabeth; BELECIBAR, Amaya; *et al.* Structure-Activity Relationships In 2-Aminodiphenylsulfides Against Trypanothione Reductase From *Trypanosoma Cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 8, p. 1175-1180, 1998.
- GOODMAN, A.G; GILMAN'S, **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 10 ed. New York: MacGraw-Hill, 2148 p: 2001.
- HENSTEN-PETTERSEN A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. **Int Endod J.** v. 21 p. 89-99, 1988.
- HIGUCHI, Mde. L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. **Rev Inst Med Trop.** v. 39, n. 1, p. 53-60, 1997.

- IARC MONOGRAPHS. VITAMIN K SUBSTANCES, v.76, 2010.
- JORGE, Tânia C. de Araújo. **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 366 p, 2000.
- KALIL, Jorge; CUNHA-NETO, Edécio. Papel das Citocinas proinflamatórias e do tipo T1 (Interferon-gama e TNF-alfa) na Patogenia da Cardiopatia Chagásica Crônica humana. **Parasitol.** v. 12, n. 396, 1996.
- KATHLEEN D. Nichols, Gordon M. Kirby. Expression of cytochrome P450 2A5 in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mouse model of oxidative stress. **Biochemical Pharmacology.** v. 75, P. 1230-1239, 2008.
- K. C. G. DE MOURA; K. Salomão, R. F. S. Menna-Barreto *et al.* Studies on the trypanocidal activity fo semi-synthetic pyran [b-4,3] naphto [1,2,3]-triazole, a new structural moiety against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 43, n. 8, p.1774-1780, 2008.
- KEISER MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nat Biotech.** v. 25, n. 2, p. 197-206, 2007.
- KNUBEL, Carolina P; Martínez, F. F; Fretes, Ricardo E. et al. Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.** v. 24, n. 8, p. 2689-2701, Aug, 2010.
- KOBAYASHI, K; NISHIUMI S; NISHIDA M. *et al.* Effects of quinone derivatives, such as 1,4-naphthoquinone, on DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory action. **Med Chem.** v. 7, n. 1, p. 37-44, Jan, 2011.
- KUBATA, Bruno Kilunga, *et al.* A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** v.196, n. 9, p. 1241-1251, nov, 2002.
- LAMSON, Davis W; Plaza, Steven M. *et al.* The Anticancer Effects of Vitamin K. **Alternative Medicine Review.** v. 8, n. 3, 2003.

- LAUCELA, S. A; ROTTENBERG M. E; DE TITO E.H. Papel das citocinas na resistência e na patologia *Trypanosoma cruzi*. **Rev Argent Microbiol.** v. 28, n. 2, p. 99-109, 1996.
- LIMA, Ricardo S; SOARES, Milena, P. B; SANTOS, Ricardo R. Cell therapy in Chagas' disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 31, n. 1, p. 87-92, 2009.
- MALAFAIA M; Rodrigues ASL. Centenário do descobrimento da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 43, n. 5, p. 483-485, set-out, 2010.
- MARIN-NETO, José A; RASSI, Jr, Anis; Chagas Heart Disease Pathophysiologic Mechanisms Prognostic Factors and Risk Stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 152-158, 2009.
- MARTINEZ-DIAZ, R. A; Escario, J. A; Nogal-Ruiz, J.J; Gómez-Barrio, A. Relationship between biological behaviour and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 96, n.2, p. 251-256, 2001.
- MATSUMOTO *et al.* Prior treatment with vitamin K2 significantly improves the efficacy of risedronate. **Osteoporos Int.** v. 20, p. 1863-1872, 2009.
- MAURA FLOREANI, Maura; Carpenedo, Francesca Modifications of Cardiac Contractility By Redox Cycling Alkylating and Mixed Redox Cycling/Alkylating Quinones. **The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics.** v. 256, n.1, 1991.
- MENNA-BARRETO, R. F; CORRÊA, J.R; SOARES, M. J; DE CASTRO, S. L.. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. **Parasitol Res.** v. 101 n. 4, p. 895-905, Sep, 2007.
- MENNA-BARRETO R. F. S; A. Henriques-Pons; A.V. Pinto, J. A. Morgado-Diaz; M. J. Soares e S. L. de Castro. Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimic**

robial Chemotherapy. v. 56, n. 6, p. 1034–1041, 2005.

- MEZIANE-CHERIF D, Aumercier M, Kora I, Sergheraert C, Tartar A, Dubremetz JF, Ouaisi MA. *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. **Exp. Parasitol.** v. 79, p. 536–541, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Assistência ao recém-nascido** - Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação Materno-Infantil. BRASÍLIA – 1994.
- MIZUSHINA, Yoshiyuki; Maeda, Jun; Irino, Yasuhiro. Effects of Intermediates between Vitamins K2 and K3 on Mammalian DNA Polymerase Inhibition and Anti-Inflammatory Activity. **Int. J. Molecular. Sciences.** v. 12, p. 1115-1132, 2011.
- MOLINA PORTELA, Maria P; Villamil, Silvia H. Fernandez; Perissino, Luiz J. *et al.* Redox Cycling Of O-Naphthoquinones In Trypanosomatids Superoxide And Hydrogen Peroxide Production. **Biochemical Pharmacology.** v. 52, p. 1875-1882, 1996.
- MORELLO, A; Pavani, M; Garbarino J. A; *et al.* Effects and mode of action of 1,4naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and Trypanosomatid parasites. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.** v. 112, n. 2, p. 119-128, 1995.
- MURATORE, Claudio A; Baranchuk, Adrian. Current and emerging therapeutic options for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. **Vascular Health and Risk Management.** v. 6, p. 593-601, 2010.
- OGAWA *et al.* Vitamins K2, K3 and K5 exert antitumor effects on established colorectal cancer in mice by inducing apoptotic death of tumor cells. **International Journal Of Oncology.** v. 31, p. 323-331, 2007.
- OLIVEIRA, Renata B. DE; Zani, Carlos L; Ferreira, Rafaela S. *et al.* Síntese, Avaliação Biológica E Modelagem Molecular De Arilfuranos Como Inibidores Da Enzima Tripanotona Redutase. **Quim. Nova.** v. 31, n. 2, p. 261-267, 2008.

- OMS - Organização Mundial da Saúde. Doença de Chagas (tripanosomíase americana) Ficha N ° 340. Junho, 2010.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Controle da Doença de Chagas. Geneva: Rep. Tec. Ser. 905, p. 1–109, 2002.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. **Cuidados hospitalares para crianças: normas para o manejo de doenças frequentes com recursos limitados.** Coord. Luiz Varandas. 2005.
- PARRY, Joel D; Pointon, Amy V; Lutz, Ursula. *et al.* Pivotal Role for Two Electron Reduction in 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone and 2-Methyl-1,4-naphthoquinone Metabolism and Kinetics in Vivo That Prevents Liver Redox Stress. **Chem. Res. Toxicol.** v. 22, n. 4 , p. 717-725, 2009.
- PONTES-DE-CARVALHO, L; Santana, Cláudia C; Soares, Milena B. P; Oliveira, Geraldo G. S; Cunha-Neto, E; Ribeiro-dos-Santos, Ricardo. Experimental Chronic Chagas' Disease Myocarditis is an Autoimmune Disease Preventable by Induction of Immunological Tolerance to Myocardial Antigens. **Journal of Autoimmunity.** v. 18, p. 131–138, 2002.
- PRAYONG, P; Barusrux, S; Weerapreeyakul, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia.** v. 79, p. 598–601, 2008.
- RASSI, Jr, Anis; MARIN-NETO, José A. Chagas Heart Disease Pathophysiologic Mechanisms Prognostic Factors and Risk Stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro. v. 104, n. 1, p. 152-158, 2009.
- RIBEIRAO M; Pereira-Chiocola V.L; Renia L; Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues M.M. Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Parasite Immunol.** v. 22, n. 1, p. 49-53, 2000.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R; Rossi M.A, Laus L, Silva J.S, Savino W, Mengel J.O. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma

cruzi. **J Exp Med.** v. 175, p. 29-39, 1992.

- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R; Mengel J.O, Postol E, Soares R.A.O; Ferreira-Fernandez, E, Soares, M.B.P; Pontes de Carvalho, L.C. A heart-specific CD4 + T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Paras Immunol.** v. 23, p. 93-101, 2001.
- ROMANHA, Álvaro J; DE Castro, Solage L; Soeiro, Maria de Nazaré C; *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 233-238, Março, 2010.
- SALAS, C; Tapia, R. A; Ciudad, K. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorg Med Chem.** v. 16, n. 2, p. 668-678, 2008.
- SALMON-CHEMIN, L; Lemaire Anick; Freitas Stephanie de ; *et al.* Parallel Synthesis of a Library of 1,4-Naphthoquinones and Automated Screening of Potential Inhibitors of Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 10, p. 631–635, 2000.
- SALMON-CHEMIN, L; Buisine, Eric ; Yardley, Vanessa ; *et al.* 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and in Vitro Cytotoxicity. **J. Med. Chem.** v. 44, p. 548 565, 2001.
- SOARES, M. B. P; Silva, C. V. Bastos, T. M. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of nicotinamide. **Acta Trop.** v.122, n. 2, p. 224-229, may, 2012.
- SOARES, Milena B. P; GARCIA, Simone; *et al.* Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. **Regenerative Med.** v. 2, n. 3, p. 257–264, 2007.

- SOARES, Milena B. P; Lima, Ricardo S; Ribeiro-dos-Santos, Ricardo; *et al.* Transplanted Bone Marrow Cells Repair Heart Tissue and Reduce Myocarditis in Chronic Chagasic Mice. **American Journal of Pathology**. v. 164. n. 2, fev, 2004.
- SOARES, M. B; Pontes-De-Carvalho L; Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 73, n. 4, p. 547-559, 2001.
- SOEIRO, Maria de Nazaré, DE CASTRO, Solange Lisboa. Drogas Tripanocidas A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz. Rio de Janeiro. Fonte: **FIOCRUZ. Doença de Chagas**. <http://www.fiocruz.br/chagas>. Acesso em 03/2008.
- SOEIRO, Maria de Nazaré C; DE CASTRO, Solange Lisboa. Screening of Potential anti- Trypanosoma cruzi Candidates: In Vitro and In Vivo Studies. **The Open Medicinal Chemistry Journal**. v. 5, p. 21-30, 2011.
- TANOWITZ, Herbert B; KIRCHHOFF, Louis V; *et al.* Chagas' Disease. **Clin Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 400-419, 1992.
- TARLETON RL. O papel de subpopulações de células T na doença de Chagas experimental. **Res. Immunol.** v. 142, p. 130-133, 1991.
- TEIXEIRA, A.R; Cunha Neto E.L. *et al.* Trypanocidal nitroarene treatment of experimental Trypanosoma cruzi infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. **J. Infect. Dis.** v. 162, n. 6, p. 1420, 1990.
- TEIXEIRA, Dirceu E; Benchimol, Marlene; Crepaldi, Paulo Henrique; DE Souza, Wanderley. Atlas Didático – Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: **Fundação CECIERJ**. Consórcio CEDERJ. 51p, 2011.
- TEIXEIRA, Dirceu; BENCHIMOL, Marlene; CREPALDI, Paulo Henrique. *et al.* Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, 13p, 2012.

- TODESCHINI, Adriane R; ALMEIDA, Eliane G. *et al.* α -N-acetylglucosamine-linked O-glycans of sialoglycoproteins (Tc-mucins) from *Trypanosoma cruzi* Colombian strain. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 (Suppl. I), p. 270-274, 2009.
- TURRENS J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects of Medicine**. v. 25, p. 211-220, 2004.
- UCHIYAMA, Nahoko. *et al.* Antichagasic Activity of Komaroviquinone Is Due to Generation of Reactive Oxygen Species Catalyzed by *Trypanosoma cruzi* Old Yellow Enzyme. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 49, n. 12, p. 5123-5126, dez, 2005.
- VANNIER-SANTOS, M. A; De Castro, S. L. Electron Microscopy in Antiparasitic Chemotherapy: A (Close) View to a Kill. **Current Drug Targets**. v. 10, p. 246-260, 2009.
- VON ARDENNE M; REITNAUER P.G; SCHMIDT D. On the toxicology of vitamin K3-sodium bisulfite and its combination with methylene blue. **Arzneimittelforschung**. v. 17, n. 11, p. 1339-1346, nov, 1967.
- WALLS, Israels, L.G. G.A., Ollmann, D.J., Friesen, E. & Israels, E.D Vitamin K as a regulator of benzo(a)pyrene metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Studies with rat microsomes and tumorigenesis in mice. **J. clin. Invest.**, v. 71, p. 1130-1140, 1983.
- WILKINSON, S.R; Prathalingam S.R, Taylor M.C, Horn D, Kelly JM. Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. **Proc Natl Acad Sci US A**. v. 102, p. 11645-11650, 2005.