Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Andréia Carolinne de Souza Brito

Atividade *in vitro* e *in vivo* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi*

Rio de Janeiro
2016

Andréia Carolinne de Souza Brito

Atividade *in vitro* e *in vivo* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.ª Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B862 Brito, Andréia Carolinne de Souza.
Atividade *in vitro* e *in vivo* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi* / Andréia Carolinne de Souza Brito. – 2016.
98 f.

Orientadora: Silvia Amaral Gonçalves da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Antiparasitários - Teses. 3. Quimioterapia - Teses. 4. Espécies de oxigênio reativas. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.937

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Andréia Carolinne de Souza Brito

Atividade *in vitro*e *in vivo* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 03 de março de 2016

Orientadora: Prof.ª Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.ª Dra. Patricia Maria Lourenço Dutra
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2016

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família e amigos que acreditam e me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que sem Ele não sou ninguém, aos meus pais, pelo amor incondicional. Eu não seria nada sem vocês. Ao meu irmão, pela ajuda nos momentos onde me sentia incapaz.

À minha orientadora Silvia Amaral Gonçalves da Silva, pela oportunidade, por sempre acreditar na minha capacidade, pela paciência durante todos esses anos, que incluíram iniciação científica e o mestrado, pelos conselhos e cuidados maternais.

Aos professores da Disciplina de Parasitologia, Alexandre Bello, Eduardo Torres, Patricia Dutra, Renata Neves e aos técnicos Yara, Erika, Fatima, Marilene, Michely e Madellon, que me auxiliaram na minha jornada acadêmica.

Aos alunos do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, Luciana Costa, Rosiane Freire, Thayssa Silva, Rafaella Meira, Larissa Siqueira, Julia Santos e Bianca Ventura que sempre me ajudaram nos experimentos do laboratório, me apoiaram, incentivaram, que me ensinaram a perfeita união entre trabalho amizade. Aos amigos, que estão ao meu lado todos os momentos, Marina Nicolau, Thais Ceciliano e Bruna Ferro, que sempre me acompanharam na faculdade e hoje mesmo nos vendo com dificuldades devido nossos estudos, sei que ainda me apóiam e torcem por mim.

Aos amigos Makoto Enoki e Dayane Oliveira pela ajuda com a microscopia, patologia e pelas horas de conversas e a técnica Vanessa Saldanha, pela ajuda nos processamentos e colorações para analises histológicas. Ao grupo do Laboratório de Interação Tripanossomatídeos e Vetores, que sempre me receberam muito bem, em especial duas pessoas, Francis Saraiva e Mariana Pitombo, a primeira por doar seu tempo, paciência e conhecimento durante os experimentos feitos no laboratório e a segunda, por me ensinar a base para iniciar meus experimentos e estudos no mestrado.

Ao Dr. Valter Neto pela ajuda com a analise bioquímica.

À Dra Natália Nogueira, Dra. Patricia Dutra e Dr. Eduardo Santos por ter aceitado fazer parte da banca examinadora

Ao Dr. Mauricio Peixoto por ter aceitado ser o revisor e suplente da banca examinadora. Ao Dr. Vítor Vidal por ter aceitado o convite para suplente da banca examinadora.

À agencia de fomento CNPq.

A educação faz com que as pessoas sejam
fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar; fáceis de
governar, mas impossíveis de escravizar.

Henry Peter

RESUMO

BRITO, Andréia Carolinne de Souza. **Atividade *in vitro* e *in vivo* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi*.** 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e endêmica na América Latina, especialmente no Brasil. A terapêutica é muito limitada, não sendo eficaz na fase crônica da infecção. A pterocarpanoquinona LQB-118 apresenta atividade antitumoral e antileishmania. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram preliminarmente que a LQB-118 possui efeito *in vitro* sobre as formas tripomastigotas metacíclicas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (clone Dm28c). O objetivo desse trabalho foi delinear *in vitro* o mecanismo de ação da LQB-118 e avaliar sua ação *in vivo* em modelo experimental de infecção. Epimastigotas de *T. cruzi* (clone Dm28c) foram incubadas na presença ou não da LQB-118 (0-5µM) por 96h/27°C e contados diariamente em câmara de Neubauer. Uma avaliação ultraestrutural de epimastigotas tratadas com 2µM LQB-118 por 24h/27°C foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada em epimastigotas pré- incubadas com LQB-118 (0-20µM) por 30 minutos à 48h/ 27°C e posteriormente marcadas com a sonda DHE. Foram utilizados ensaios com o antioxidante MitoTEMPO e o pró-oxidante Antimicina A incubados por 30 minutos, com a pterocarpanoquinona nas concentrações de 10 µM ou 20µM. Foi feito também a análise *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos foi realizado através do programa ADMET. Os experimentos *in vivo*, foram realizados a partir de dois modelos distintos usando camundongos *Swiss* infectados com 10^3 de tripomastigotas sanguíneas (cepa Y) via intraperitoneal. No primeiro modelo, camundongos foram tratados pela via oral com LQB-118 (20 mg/Kg de peso/dia), por 11 dias a partir de 7º dia pós-infecção (dpi) e no segundo tratados pela via oral com LQB-118 (40 mg/Kg de peso/dia) , por 12 dias a partir de 4º dpi. Foram avaliados a parasitemia, taxa de sobrevivência, peso dos órgãos, análise de parâmetros séricos bioquímicos e histopatologia preliminar do coração. Como resultados, a LQB-118 foi capaz de inibir significativamente ($p<0,0001$) o crescimento do parasito já em 48h de cultura, com 99,67% de inibição em 96h a concentraçõe de 5 µM. O IC_{50} em 48h foi de 2,34±0,20µM e em 96h foi de 0,88±0,08µM. Na avaliação ultraestrutural, foram observados alterações na morfologia do retículo endoplasmático, aumento na região do cinetoplasto e vacúolos próximos a bolsa flagelar. A LQB-118 induziu um aumento de ROS produzido pelo parasito no tempo de 30 minutos de incubação quando tratadas com 10µM e 20µM do composto. Os animais tratados com LQB-118 apresentaram redução da parasitemia nos dois modelos propostos. No primeiro, no 15º dpi, a redução da parasitemia foi de 37,8%. No segundo, a redução da parasitemia observada a partir do 11° dpi, foi de 49,47% ($p< 0,02$) e 50,17% no 16º dpi. A análise bioquímica sérica mostrou que houve diminuição de creatina nos animais tratados com a LQB-118. A análise histológica preliminar indicou uma diminuição dos danos cardíacos nos animais tratados. Em conjunto, esses resultados demostram que a LQB-118 apresenta atividade tripanocida, altera produção de ROS do parasito e sugere ação protetora do composto nos ensaios *in vivo* durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Pterocarpanoquinona LQB-118. Quimioterapia. ROS. *In vivo.*

ABSTRACT

BRITO, Andréia Carolinne de Souza. **Activity *in vitro* and *in vivo* of pterocarpanquinone LQB-118 on *Trypanosoma cruzi* 2016.** 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and endemic in Latin America, especially in Brazil. The therapy is very limited, not being effective in the chronic phase of infection. The LQB-118 pterocarpanoquinona shows antitumor and antileishmanial activities. Previous studies from our group have shown preliminarily that LQB-118 has an *in vitro* effect on trypomastigotes and intracellular pimastigot of *T. cruzi* (Dm28c clone). The aim of this work was to study *in vitro* the LQB-118 mechanism of action and evaluate its activity by the *in vivo* infection experimental model. Epimastigotes of *T. cruzi* (Dm28c clone) were incubated in the presence or absence of LQB-118 (0-5µM) for 96h/27°C and quantified daily by Neubauer chamber. An ultrastructural evaluation of pimastigota treated 2µM LQB-118 for 24/27°C was performed by transmission electron microscopy. The production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated in pimastigota incubated in the presence or absence of LQB-118 (0-20µM) for 30 minutes to 48 hours/27°C and subsequently labeld with DHE probe. Tests using the antioxidant MitoTEMPO and pro-oxidant Antimycin A for 30 minutes were carried out using, cells treated with 10 or 20µM LQB-118. *In silico* analysis of the pharmacokinetic parameters was performed using the ADMET program. *In vivo*, two assays were conducted using *Swiss* mice were infected with 10^3 blood trypomastigotes (Y strain) intraperitoneally. In the first test, mice were treated orally with LQB-118 (20 mg/kg/day), for 11 days from the 7º day post-infection (dpi) and in the second were treated orally with LQB-118 (40 mg/kg/day, for 12 days from 4º dpi). We evaluated the parasitemia, survival rates, organ weights, biochemical parameters analysis of serum and preliminary histopathology in the heart. The LQB-118 was able to inhibit significantly ($p<0.0001$) the growth of the parasites at 48h and after 96h the inhibition was 99,67% at 5 uM. The IC50 in 48 hours was 2,34 ± 0,20µM and 96h was 0,88 ± 0,08µM. In ultrastructural evaluation, we observed in the morphology of the endoplasmic reticulum changes, swelling of the kinetoplast region and vacuoles near the flagellar pocket. We observed that LQB-118 induced increase parasite ROS production at 30 minutes of incubation when treated with 10µM and 20µM of LQB-118, respectively. The parasitemia in animals treated in LQB-118 decreased both assays. In the first experiment, the 15° dpi, the parasitemia reduction was 37,8%. In the second test, the parasitemia reduction was observed from the 11° dpi, a decrease of 49,47% ($p<0.02$) at 11º dpi, and 50,17% at 16º dpi. Serum biochemical analysis showed that there was a creatine decrease in animals treated with LQB-118. Preliminary histological analysis and indicated a cardiac damage decrease in the treated animals. These results showed that LQB-118 has activity against *T. cruzi* causing alteration in the parasite ROS production and has protective action *in vivo* during the infection acute phase.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Pterocarpanquinone LQB-118. Chemotherapy. ROS. *In vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*..... 22
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*... 28
Figura 3 - Classificação taxonômica da classe Insecta..... 33
Figura 4 - Principais vetores da doença de Chagas..... 34
Figura 5 - Distribuição dos casos da doença de Chagas em todo mundo com estimativas oficiais de 2010-2013..... 37
Figura 6 - Sinais no local de penetração do *T. cruzi*..... 39
Figura 7 - Radiografias do coração, esôfago e cólon, representando a comorbidades da doença de Chagas na fase crônica..... 40
Figura 8 - Estrutura química dos fármacos utilizados contra a doença de Chagas..... 44
Figura 9 - Classificação das quinonas..... 46
Figura 10 - Estrutura química da LQB-118 e de seus precursores..... 49
Figura 11 - Desenho experimental do ensaio *in vivo* 1 (piloto)..... 57
Figura 12 - Figura 12 – Desenho experimental do ensaio *in vivo* 2..... 58
Figura 13 - Efeito da LQB-118 no crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*..... 65
Figura 14 - Varredura fluorimétrica da LQB-118..... 66
Figura 15 - Cinética de produção de ROS induzido por LQB-118..... 67
Figura 16 - Produção de ROS por epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) tratadas com LQB-118..... 68
Figura 17 - Alterações ultraestruturais observadas em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118 por MET..... 69
Figura 18 - Curva de parasitemia de animais tratados com LQB-118..... 71
Figura 19 - Acumulo de mortalidade..... 72
Figura 20 - Peso relativo do coração, baço e fígado de animais infectados ou não com *T. cruzi*..... 73
Figura 21 - Curva de parasitemia de animais infectados com *T. cruzi*..... 74
Figura 22 - Acumulo de mortalidade..... 75
Figura 23 - Peso relativo do coração, baço e fígado dos animais infectados ou não

com *T. cruzi*..... 76
Figura 24 - Parâmetros bioquímicos..... 78
Figura 25 - Análise histopatológica do coração de animais infectados ou não com *T. cruzi*..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atual classificação de *Typanossoma cruzi*..... 26

Tabela 2 - Características e ocorrência das principais espécies transmissoras da doença de Chagas..... 35

Tabela 3 - Relação da percentagem da população de áreas endêmicas com a soroprevalência da doença de Chagas (DC)..... 38

Tabela 4 - Características do Benznidazole Nifurtimox..... 45

Tabela 5 - Etapas do processamento do coração..... 61

Tabela 6 - Etapas da coloração de Hematoxilina-Eosina nos cortes de coração..... 62

Tabela 7 - Análise *in silico* das propriedades toxicológicas das da LQB-118..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity* (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade)
ADP	*Adenosine diphosphate* (Adenosina difosfato)
ALT	*Alanine Aminotransferase* (Alanina Aminotransferase
AMPc	*Adenosine monophosphate cyclic* (adenosina monofosfato cíclico)
ATP	*Adenosine triphosphate* (Adenosina trifosfato)
BHI	*Bacto Brain Heart Infunsion* (Infusão de Cérebro e Coração)
Ca^{++}	Cálcio divalente
CK	Creatine kinase (Creatina quinase)
CO_2	Dióxido de carbono / gás carbônico
CYP450	*Cytochrome P450* (Citocromo P450)
DC	Doença de Chagas
DHE	*Dihydroethidium* (Dihidroetídio)
DMSO	*Dimethyl sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
DTU	*Discrete typing units* (Unidades Discreta de Tipagem)
EMS	*Electron Microscopy Sciences*
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
Fe^{3+}	Ferro trivalente
GPO	*Glycerol-3-phosphate oxidase* (Glicerol-3-fosfato oxidase)
gp35/50	Glicoproteína 35/50
gp82	Glicoproteína 82
HE	Hematoxilina-Eosina
hERG	*Human ether-a-go-go-related gene*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HXK	*Hexokinase* (Hexoquinase)
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IC_{50}	Concentração inibitória de 50% de parasitos
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
kDNA	*Kinetoplatid* DNA (DNA do cinetoplasto)

LIT	*Liver Infusion Tryptose*
LMC	Leucemia mielóide crônica
LPC	*Lysophosphatidylcholine* (Lisofosfatidilcolina)
LQB	Laboratório de Química Biorgânica
MitoTEMPO	*(2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl) triphenylphosphonium*
MLEE	*Multi locus enzyme electrophoresis* (perfil eletroforético de multiloci de enzimas)
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	*Nicotinamide adenine dinucleotide* (Nicotinamida adenina dinucleotídeo)
NADPH	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
O_2^-	Íon superóxido
OMS (WHO)	Organização mundial da Saúde (*World Health Organization*)
PBS	*Phosphate-buffered saline* (Tampão Fosfato de Sódio/ Tampão fosfato salina)
PEP	*phosphoenolpyruvate* (Fosfoenolpiruvato)
PFK	*Phosphofructokinase* (Fosfofrutoquinase)
PGK	*Phosphoglycerate kinase* (fosfoglicerato quinase)
PIP_3	*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato)
PYK	*Pyruvate kinase* (piruvato quinase)
RAPD	*Random Amplified Polymorphic* DNA (ampliação randômica de DNA polimórfico)
rDNA	*Ribosomal* DNA (DNA ribossomal)
ROS	*Reactive oxygen species* (Espécies Reativas de Oxigênio)
SFB	Soro fetal bovino
TAUP	*Triatomine artificial urine suplemented with L-proline* (Urina de Triatomíneo artificial suplementado com prolina)
TAU3AAG	TAUP *suplemented with glucose, L-aspartate and L-glutamate* (TAUP suplementado com glicose, ácido aspártico e glutamato de sódio)
TCA	*Tricarboxylic acid* (Ácido tricarboxilico)

TcTOX	*C9 cross-reactive protein*
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentagem
pH	Potencial de hidrogênio
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
g	Força g
x	Vezes
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
M	Molar
nm	Nanometro
mm	Milimetro
±	Mais ou menos
º	Indicador ordinal masculino
p	Nível descritivo do teste
dL	Decilitro
U	Unidade
L	Litro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	**OBJETIVOS**	50
1.1	**Geral**	50
1.2	**Específicos**	50
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	51
2.1	**LQB-118**	51
2.2	**Parasito**	51
2.3	**Cultivo do clone Dm28c**	51
2.4	**Cultivo e manutenção da cepa Y**	52
2.5	**Avaliação da atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre formas epimastigotas**	52
2.6	**Efeito da LQB-118 na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c**	53
2.7	**Análise ultraestrutural de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118**	54
2.8	**Análise de parâmetros farmacocinéticos *in silico***	55
2.9	**Ensaio *in vivo***	55
2.9.1	Animais	56
2.9.2	Infecção experimental	56
2.9.2.1	Ensaio piloto 1	56
2.9.2.2	Ensaio piloto 2	57
2.9.3	Avaliação da parasitemia e mortalidade	59
2.9.4	Avaliação clínica	60
2.9.5	Avaliação dos parâmetros bioquímicos	60
2.9.6	Processamento, preparo dos cortes e coloração (Hematoxilina-Eosina) das amostra para análise histopatológica	60
2.9.7	Análise histopatológica	62
2.10	**Análise estatística**	63
3	**RESULTADOS**	64
3.1	**Efeito da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre as formas epimastigotas**	

Trypanosoma cruzi **(clone Dm28c)**..... 64
3.2 **Efeito da LQB-118 na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c)**..... 66
3.3 **Análise ultraestrutural de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118**..... 68
3.4 **Análise *in silico***..... 69
3.5 **Ensaios *in vivo***..... 70
3.5.1 Ensaio 1..... 70
3.5.1.1 Curva de parasitemia..... 70
3.5.1.2 Mortalidade..... 71
3.5.1.3 Peso dos órgãos..... 72
3.5.2 Ensaio 2..... 74
3.5.2.1 Curva de parasitemia..... 74
3.5.2.2 Mortalidade..... 75
3.5.2.3 Peso dos órgãos..... 75
3.5.2.4 Análise bioquímica..... 77
3.5.2.5 Análise histopatológica..... 78
4 **DISCUSSÃO** 81
CONCLUSÃO..... 90
REFERÊNCIAS..... 91

INTRODUÇÃO

DOENÇA DE CHAGAS: UMA DOENÇA NEGLIGEMCIADA

As doenças negligenciadas são injúrias que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam um forte entrave ao desenvolvimento dos países, principalmente nas regiões como África, Ásia e América Latina. Elas são ainda a principal causa de mortalidade, invalidez crônica e pobreza no mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial (Pedrique *et al*, 2013; Decit, 2010).

Apesar de existir financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se converteu em avanços terapêuticos, como novos fármacos, métodos para diagnósticos e vacinas (Pedrique *et al*, 2013; Decit, 2010). De todos os medicamentos aprovados entre os anos de 2000 a 2011, apenas 4% foram destinados às doenças negligenciadas, apesar desse grupo somar 11% da carga global dos problemas de saúde. Da mesma forma, apenas 1% de todos os ensaios clínicos existentes até 2011, eram para doenças negligenciadas (Pedrique *et al*, 2013).

O Organização Mundial de Saúde reconhece 17 (dezessete) doenças negligenciadas das quais, treze são endêmicas no Brasil. Entre os anos de 2000 à 2011 foram registradas 76.847 mil mortes relacionadas as essas doenças no Brasil, sendo que 76,7% (58.928) das mortes estão correlacionadas com a doença de Chagas, seguida da esquistossomose responsável por 8,2% (6.319) e leishmaniose com 4,5% (3.466) (Martins-Melo *et al*, 2016).

Entre as doenças negligenciadas, a doença de Chagas é a maior causadora de mortalidade no Brasil, tornando-se um grave problema de saúde pública brasileira.

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose do continente americano que se estende desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile. (Rey, 2008). Há evidências da doença em populações nativas da América (Araujo *et al*, 2009), tendo sua expansão na era pós-colombiana, devido as enormes mudanças demográficas e ecológicas provocadas pelos conquistadores hispânicos e portugueses. Nas últimas décadas, com o fenômeno migratório, pessoas infectadas foram distribuídas para todas as regiões do

mundo, principalmente a partir do segundo terço do século 20, quando a a migração rural/urbana se intensificou em vários países (Coura, 2013).

A história da descoberta dessa doença é única nos anais da medicina. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas conduziu entre os anos de 1907 e 1909 o controle de malária na região de Lassance, Minas Gerais, Brasil. Foi quando identificou no tubo digestivo de hemípteros hematófagos, capturados em choupanas da área, um protozoário flagelado. Em 1909, descobriu seu primeiro caso, uma menina febril de 2 anos de idade, chamada Berenice, e posteriormente registrado mais 28 casos agudos e inúmeros crônicos da nova doença (Coura, 2013). A grande capacidade de percepção de Carlos Chagas permitiu que ele conseguisse descrever em curto espaço de tempo, o parasito (*T. cruzi*), seus reservatórios silvestres, seu desenvolvimento nos triatomíneos e as características clínicas da doença (Zingales, 2011).

O reconhecido definitivo desssa doença veio nas décadas de 1940 e 1950 e foram estabelecidas as bases do seu controle, mediante fundamentais pesquisas realizadas principalmente no Brasil (Coura, 2013).

A parasitose se origina de um ciclo primitivo do *Trypanosoma cruzi*, que começou milhões de anos com natureza eminentemente enzoótica, circulando o flagelado entre vetores e reservatórios silvestres ao longo da maior parte do continente americano, há milhares de anos. A endemia se estabeleceu há 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, o que promoveu a adaptação dos triatomíneos, por falta de alimentos, a um novo nicho, incluindo a alimentação do sangue humano e animais domésticos (Zingales, 2011; Coura e Borges-Pereira, 2010)

Os levantamentos epidemiológicos realizados em países da América Latina indicam que a doença de Chagas possui duas fases (aguda e crônica) e diferentes apresentações clínicas, formas cadíacas e digestivas. A cardiopatia inflamatória afeta, aproximadamente, 30% dos indivíduos infectados, 5-10% podem desenvolver a forma digestiva, porém, a maioria permanece assintomático (70%). As manifestações da doença e a suscetibilidade ao tratamento variam de acordo com a região (Cunha-Neto e Chevillard, 2014; Zingales, 2011).

Os únicos medicamentos aprovados para o tratamento humano para doença de Chagas são o benznidazol e o nifurtimox, lançados no inicio de 1970. Os dois medicamentos compartilham algumas característica como melhor tolerância em crianças, mais eficiência durante a fase aguda, maior toxicidade em adultos e suscetibilidade entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (Bermudez *et al*, 2016)

Trypanosoma cruzi

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, gênero *Trypanosoma* (Haag *et al*, 1998).

A família Tripanosomatidae reúne grande número de espécies com características em comum, com a presença de um rede de kDNA (DNA fibrilar) e de um único flagelo que emerge de um bolso anterior ou lateralmente, aderido ao corpo celular (Rey, 2008). Os tripanosomatideos são evolutivamente bem sucedidos, por se encontrarem em quase todo o planeta e pela capacidade de parasitar todos os grupos de vertebrados, vários invertebrados e plantas. (Lopes *et al*, 2010). Nove gêneros pertencem a essa família, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Phytomonas* e *Leishmania*. Desses gêneros, dois parasitam o homem, o gênero *Trypanosoma* e o gênero *Leishmania* (Coura, 2013; Lopes *et al*, 2010). O gênero *Leishmania* apresenta diversas espécies que causam as leishmanioses tegumentares e a visceral. As doenças provocada pelo gênero *Trypanosoma* são a tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* e a tripanossomíase africana ou doença do sono, caudada por *Trypanosoma brucei gambiensis* ou por *T. brucei rhodesiense* (Coura, 2013; Markell *et al*, 2003).

A partir do sul dos Estados Unidos, México e se estendendo pela América Central e América do Sul até a Argentina, podem-se encontrar vários roedores silvestres, entre eles, gambás e tatus, infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. O gambá é um dos reservatórios silvestres mais importantes, uma vez que eles circulam entre o ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico em busca de alimentos. Esse parasito foi encontrado pela primeira vez no inseto reduvídeo *Panstrogylus megistus* e mais tarde no homem, pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (Zingales, 2011; Markell *et al*, 2003).

Para adaptar-se a diferentes situações bioecológicas, o *T. cruzi* assumiu diferentes formas evolutivas, sendo as três principais, epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 1) (Coura, 2013.)

A membrana citoplasmática com seus constituintes é importante pela interface entre protozoários e seu ambiente. Os tripanossomatideos possuem a membrana celular muito parecida com a de outros eucariotos, porém, eles apresentam microtúbulos subpeculiares firmemente ligados à superfície interna da membrana. O *T. cruzi*, por ser um parasito intracelular, é capaz de interagir inicialmente com as superfícies celulares do hospedeiro

vertebrado e, em seguida, com a membrana do vacúolo parasitóforo, bem como com as células epiteliais do hospedeiro invertebrado. Para tal, uma grande variedade de moléculas são encontradas na superfície do *T. cruzi*, entre elas, incluem as mucinas, transialidase e a família da glicoproteínas Tc85 (Lopes *et al*, 2010; Souza, 2009).

A membrana plasmática do *Trypanosoma cruzi* não é homogênea, em relação a densidade e distribuição das partículas intramenbranosas. Pode-se definir três macrodomínios (corpo da célula, o flagelo e a bolsa fagelar) que por sua vez possuem microdomínios específicos como o colar flagelar (localizado na região basal do flagelo), a zona de ligação do flagelo ao corpo celular e a região do citóstoma (Souza, 2009).

O flagelo emerge a partir de um corpo basal no citoplasma através de uma proeminente invaginação da membrana (bolsa flagelar), sendo composto por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Essa estrutura está presente em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, porém, nas formas amastigotas, o flagelo é extremamente curto, não podendo ser visualizado em microscopia de luz. Essa estrutura é essencial a biologia do parasito no interior dos hospedeiros. O flagelo possui uma haste paraflagelar altamente antigênica e fundamental para a sobrevivência do parasito (Lopes *et al*, 2010; Souza, 2009).

Outra organela extremamente importante é a mitocôndria. Os tripanosomatídeos apresentam mitocôndria única e altamente ramificada, onde se localiza uma estrutura específica desta ordem, o cinetoplasto. A maioria das proteínas mitocondriais são sintetizadas em ribossomos livres e em seguida, transportados para a organela. O cinetoplasto é uma estrutura que possui forma e organização estrutural que variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito, localizado perto do corpo basal. Estruturas filamentosas ligam o cinetoplasto ao corpo basal e por isso essa região define o local onde o corpo basal está localizado e a origem do flagelo (Lopes *et al*, 2010; Souza, 2009). Por ter características estruturais e funcionais distintas dos mamíferos, a mitocôndria desses parasitos é um alvo atraente para quimioterápicos (Menna-Barreto *et al*, 2009)

Os glicossomos são encontrados apenas nos membros da ordem Kinetoplastida e relacionam evolutivamente aos peroxissomos de eucariotos superiores. É uma organela onde ocorre a maior parte da via glicolítica. Varias vias metabólicas alternativas como, fixação de CO_2, síntese de purinas, biossíntese de pirimidinas, alongamento de ácidos graxos, biossíntese de isoprenóides e esteróides ocorrem nos glicossomos (Lopes *et al*, 2010; Souza, 2009).

Os acidocalcissomas são organelas envolvida em diversas funções no parasito como armazenamento de cálcio, fósforo, sódio, potássio, zinco e magnésio, homeostase do pH e osmorregulação juntamente com o vacúolo contrátil (Lopes *et al*, 2010; Souza, 2009).

O vacúolo contrátil, por sua vez, é uma estrutura formada por vários túbulos ligados a um vacúolo central e está envolvida no processo de regulação osmótica, já que aquaporinas (proteína envolvida no transporte de água) foram encontradas tanto nos acidocalcissomas como no vacúolo contrátil (Souza, 2009).

A via secretora do *T. cruzi* é formada pelo retículo endoplasmático, complexo de Golgi e um sistema de vesículas que nascem das cisternas do complexo de Golgi e migram para a bolsa flagelar, onde se fundem a bolsa flagelar e descarregam o seu conteúdo. As cisternas do retículo endoplasmático são vistas ao redor do núcleo e se distribuem para todas as regiões celulares. O complexo de Golgi localiza-se próximo a bolsa flagelar (Souza, 2009).

A endocitose é o mecanismo básico para a internalização de macromoléculas, porém o *T. cruzi*, apresenta algumas particularidades na sua via endocítica, como, (1) essa via só ocorre em epimastigotas (forma encontrada no hospedeiro invertebrado) ou em culturas axênica mantidas em laboratório, é baixa ou ausente em tripomastigotas metaciclícos ou sanguíneos e nas formas amastigotas intracelulares, (2) apenas dois locais realizam a endocitose, a bolsa flagelar e a região do citóstomo e (3) as vesículas formadas na endocitose, se fundem aos reservossomos (Souza, 2009).

Os reservossomos são organelas que possuem um papel vital no ciclo de vida do *T. cruzi*, relacionado diretamente com a diferenciação celular. Essas organelas acumulam todas as moléculas endocitadas, além disso, possuem enzimas lisossomais, como peptisase, cruzipaína e serina carboxipeptisase. É o principal local de armazenamento de lipídeos e proteínas (endocitadas ou produzidas pelo parasito), degradação e reciclagem de proteínas (Lopes *et al*, 2010; Souza, 2009)

Nos hospedeiros vertebrados encontram-se as formas tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares, já no hospedeiro invertebrado encontram-se as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.

Os epimastigotas são formas muito móveis, com o cinetoplasto situado próximo ao núcleo e a bolsa flagelar apresenta-se lateralmente. O flagelo emerge longe da extremidade anterior, se mantém-se junto à membrana do citossomo por uma prega de bainha flagelar (membrana ondulante) e após ultrapassar o pólo anterior da célula, torna-se livre. Essas formas são encontradas basicamente no tubo digestivo do inseto vetor e em meios artificiais de cultivo, onde se multiplicam por divisão binária (Figura 1 A) (Coura, 2013; REY, 2008).

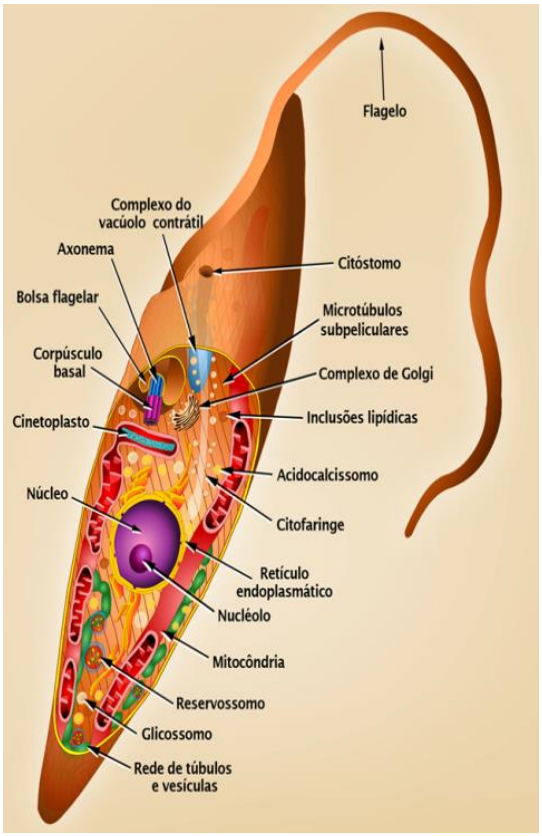
Os tripomastigotas são formas infectantes, com corpo celular fusiforme e o cinetoplasto e o bolso flagelar apresentam-se deslocados para a região entre o núcleo e a extremidade posterior. O flagelo é longo, emergindo do corpúsculo basal justacinetoplasto e

percorrendo todo o corpo celular no sentido longitudinal, fazendo protrair a membrana celular característica (membrana ondulante). São formas extracelulares, encontradas no sangue periférico do hospedeiro vertebrado e nas porções terminais do tubo digestivo e de Malpighi do inseto vetor (Figura 1B)(Coura, 2013; REY, 2008).

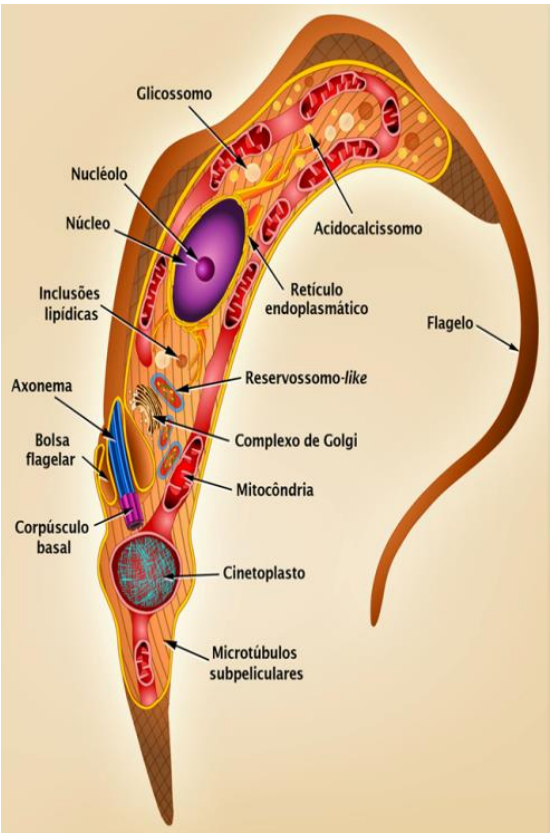
Os amastigotas são formas de pequenas dimensões, contorno aproximadamente circular, ovóide ou fusiforme e sem flagelo exteriorizado. O corpo é achatado com núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico e o cinetoplasto bem visível. Essas formas são responsáveis pela multiplicação binária no hospedeiro vertebrado, onde subsistem exclusivamente no interior de diversos tipos celulares (Figura 1C) (Coura, 2013; REY, 2008).

Figura 1 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

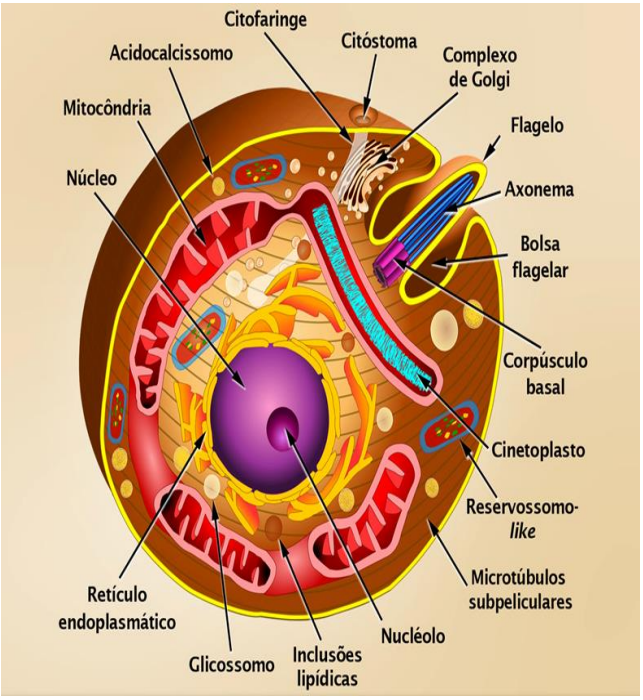
A



B



C



Legenda: A) Forma epimastigota (forma replicante e encontrada no hospedeiro invertebrado); B) Forma tripomastigota (forma não replicante e encontrada no hospedeiro vertebrado) e C) Forma amastigota (forma intracelular, replicante e encontrada no hospedeiro vertebrado). As formas estão em corte longitudinal mostrando as principais estruturas.
Fonte: Adaptado de Teixeira *et al*, 2012.

Durante o ciclo biológico, os tripanossomatídeos são bem adaptados morfologicamente e metabolicamente. A medida que passam por sucessivas fases de diferenciação, podem encontrar ambientes altamente diferentes nos quais devem adaptar rapidamente seu metabolismo para lidar com essas alterações (Michels *et al*, 2006), como por exemplo, nas formas epimastigotas que ao se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos no trato digestivo dos triatomíneos encontram um meio rico em aminoácidos e pobre em glicose (Silber *et al*, 2009).

Uma das adaptações presentes nos tripanossomatídeos é sua capacidade de substituir rapidamente os glicossomos por outros, com diferentes características metabólicas, durante a transição entre as distintas fases do ciclo biológico, podendo assim aumentar sua adaptabilidade a diferentes condições ambientais (Michels *et al*, 2006).

No hospedeiro vertebrado, na corrente sanguínea, o parasito depende do fornecimento contínuo de glicose do sangue e fluidos corporais do seu hospedeiro. Todo o ATP sintetizado vem a partir da conversão de glicose em piruvato. As primeiras sete enzimas responsáveis por essa conversão da glicose em 3-fosfoglicerato estão presentes dentro do glicossomo, enquanto as três últimas responsáveis pela catálise dessa via estão localizadas no citosol. O consumo e

produção de ATP e NADH pela glicólise dentro do glicossomo é equilibrada, onde o primeiro é realizado pela hexoquinase (HXK) e fosfofrutoquinase (PFK) e o segundo realizado pela fosfoglicerato quinase (PGK). A formação do ATP ocorre no citosol, em uma reação catalisada pela piruvato-quinase (PYK). O NADPH glicossomal resultante da reação catalisada por gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, é reoxidado no interior do glicossomo através do glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) mitocondrial (Bringaud *et al*, 2006; Michels *et al*, 2006). Esse equilíbrio redox glicossomal é realizado pelo fornecimento de duas enzimas oxidoredutases glicossomais que permitem a reoxidação do NADH. Essas enzimas são fornecidas durante a produção do succinato (fermentação succínica). (Bringaud *et al*, 2006; Bakker *et al*, 2000).

Devido à uma aparente falta de regulação nas atividades das enzimas glicolíticas, HXK e PFK, pode ocorrer o acúmulo de intermediários da via glicolítica, o que pode ser altamente tóxico para o parasito. Porém, estudos computacionais mostram que o fato de algumas enzimas da via glicolítica (HXK e PFK) do parasito serem compartimentalizadas no glicossoma, organela que possui uma membrana pouco permeável para solutos, evita o contato direto dessas enzimas com as concentrações relativas de ATP/ADP do citosol, permitindo sua exposição exclusivamente às quantidades de ATP/ADP glicossomal. Dessa maneira, o parasito evita o possível acúmulo tóxico dos intermediários da via, compensando a falta de regulação das enzimas (Michels *et al* 2006).

A compartimentação da glicólise nos glicossomos parece ser essencial para a regulação deste processo, permite as células superar curtos períodos de anaerobiose, além de permitir que os parasitos se adaptem rapidamente e eficientemente às novas condições (Michels *et al*, 2006).

No inseto vetor, os tripanossomatídeos realizam um metabolismo fermentativo, uma vez que a glicose e a L-prolina são convertidos em succinato e em menor grau em acetato. Em ambientes onde glicose e aminoácidos estão disponíveis, as epimastigotas de *T. cruzi* consomem preferencialmente glicose (Michels *et al*, 2006; Bringaud *et al*, 2006). A fermentação succínica oferece uma significativa vantagem por exigir apenas metade do fosfoenolpiruvato (PEP) produzido para a manutenção do equilíbrio NAD+/NADH, o PEP restante é convertido em acetato, L-lactato, L-alanina e/ou etanol. Essa ramificação da via catabólica da glicose pode proporcionar uma importante flexibilidade pra uma adaptação rápida a alteração ambiental (Bringaud *et al*, 2006).

Outra característica que merece destaque do *T. cruzi* é sua heterogeneidade em relação a diversidade biológica, bioquímica e genética das cepas, juntamente com a sua complexidade

eco-epidemiológica (Zingales *et al*, 1999). As diferenças nas taxas de crescimento, a infectividade, o tropismo tecidual, composição antigênica, virulência e morbidade em modelos animais, suscetibilidade a componentes imunes do soro e a quimioterápicos, tem sido relatados em parasitos isolados (Martínes-Dias *et al*, 2001).

Ao longo dos anos, várias abordagens tem sido usadas para caracterizar as populações do *T. cruzi*, definindo o no número de subgrupos importantes. Esses subgrupos receberam diferentes designações, como zimodemas (características bioquímicas), esquizodemas (proteases e peptidades), biodemas (características biológicas) e unidades de tipagem discreta (DTU) (Zingales *et al*, 2009).

Quando o genoma do *T. cruzi* foi sequenciado, estimou-se que 50% do genoma era composto por sequências, que consistem principalmente, de grandes famílias de genes de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricos (Lopes *et al*, 2010). Em 1999, um consenso sobre as cepas do *T. cruzi* foi atingido e duas linhagens principais foram descritas. Vários marcadores biológicos e moleculares foram utilizados, tais como a análise de isoenzimas e o polimorfismo no 24S rDNA. Deste modo o *T. cruzi* foi separado em dois grandes grupos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. As cepas de *T. cruzi* I estão associados com o ciclo de transmissão silvestre. São menos resistentes aos fármacos tripanomicida e está associado à doença humana em todos os países endêmicos ao norte da Bacia Amazônica, onde provoca infecções esporádicas e assintomáticas. Entretanto, as cepas de *T. cruzi* II estão associados com o ciclo de transmissão domiciliar, mais resistentes à fármacos tripanocidas e causa infecções humanas com alta parasitemia (Lopes *et al*, 2010; Rassi Jr *et al*, 2010). Em 2006, a existência de uma linhagem *T.cruzi* III foi reportada e representaria as cepas que ainda não haviam previamente sido caracterizadas, ou cuja caracterização não era considerada concluída (Rassi Jr *et al*, 2010; Dutra *et al*, 2010).

Em 2009, em um encontro científico ocorrido no Rio de Janeiro em comemoração ao centenário da descoberta da doença de Chagas, a classificação foi revisada. A nova classificação foi baseada na genotipagem de *multilocus* que revelou seis distintas DTUs (*Discrete typing units*), com duas subdivisões, denominadas DTU I e II. O DTU II ainda foi dividido em cinco DTUs, IIa-e, com base em informações filogenéticas de MLEE (perfil eletroforético de multiloci de enzimas) e RAPD (perfil eletroforético de ampliação randômica de DNA polimórfico). Os DTUs I e IIb, correspondem aos grupos *T. cruzi* I e II, respectivamente (Tabela 1) (Dutra *et al*, 2010; Zingales *et al*, 2009).

Tabela 1- Atual classificação de *Typanossoma cruzi*

DTU	**Classificação antiga equivalente do *T. cruzi***
T. cruzi I	DTU I e *T. cruzi* I
T. cruzi II	DTU IIb e *T. cruzi* II
T. cruzi III	DTU IIc, *T. cruzi* III, Z3 e Z3/Z1 ASAT
T. cruzi IV	DTU IIa, Z3 e Z3-B
T. cruzi V	DTU IId, Z2 Boliviano
T. cruzi VI	DTU IIe e Z2 Paraguaio

Fonte: Adaptado de Zingales *et al*, 2009

Em seres humanos, um amplo espectro de apresentações clínicas da doença de Chagas é observado, o que parece refletir a heterogeneidade entre as cepas de *T. cruzi* e/ou diferenças genéticas da resposta imune do hospedeiro (Martínes-Dias *et al*, 2001).

Ciclo Biológico

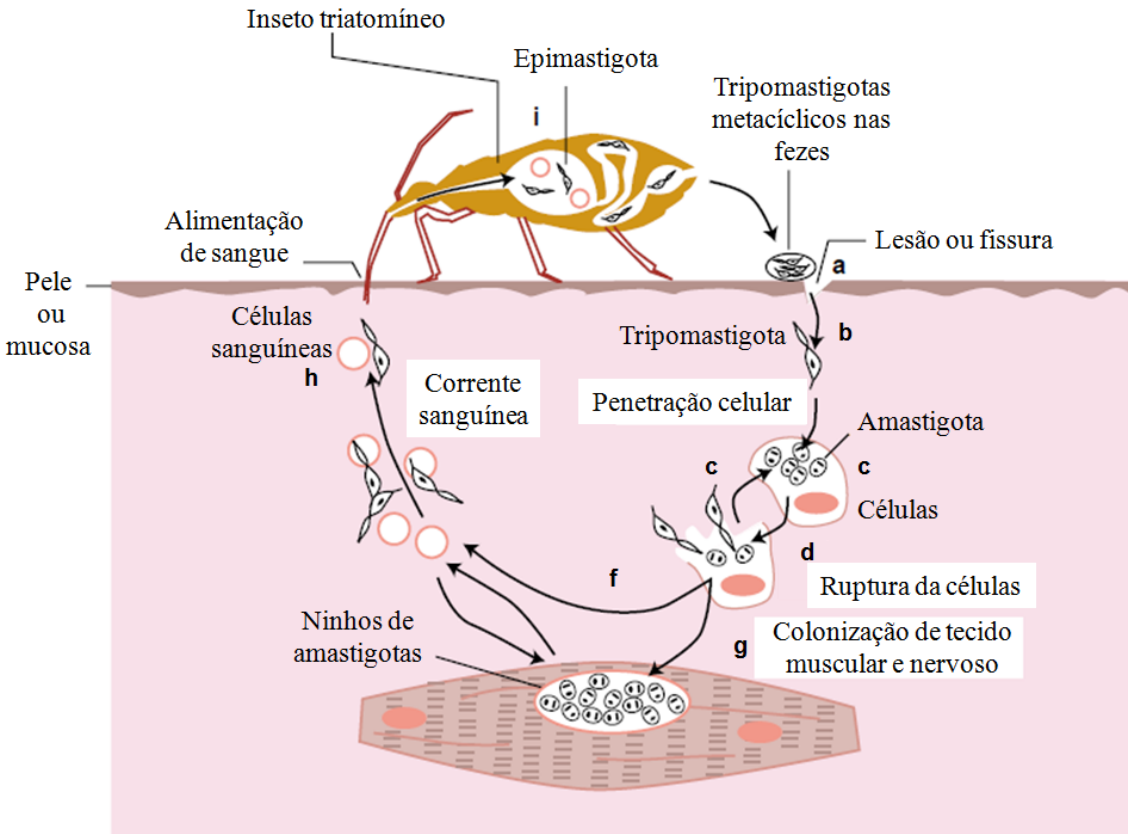
O *Trypanosoma cruzi* exibe um ciclo biológico complexo com vários estágios de vida que se alternam entre o inseto vetor e hospedeiros mamíferos (Figura 2). Durante o hematofagismo restrito, os vetores invertebrados (triatomíneos) do *T. cruzi* ingerem formas tripomastigotas sanguíneas do parasito presente na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante seu repasto. No estômago dos triatomíneos desencadeiam-se as primeiras transformações do parasito, formando as formas epimastigotas. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, alguns se movem para o intestino terminal e para os tubos de Malpighi. No reto (porção final do tubo digestivo), após múltiplas rodadas de multiplicação, os epimastigotas aderem-se ás células epiteliais e iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (forma infectante para os vertebrados) (Coura, 2013; Machado *et al*, 2012; Dutra *et al*, 2010).

Os estímulos conhecidos para desencadear a diferenciação incluem a queda de pH abaixo de 5,5 e o estresse metabólico (Ferreira, 2012). Os tripomastigotas perdem aderência pelo epitélio intestinal, sendo liberados na luz intestinal (Ferreira, 2012). As dejeções do inseto contem fezes e urina, ambas contendo os tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados para o meio externo e constituem a forma infectante. (Coura, 2013; Neves *et al*, 2011).

Os tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes e urina do triatomíneo, durante ou após um repasto sanguíneo, penetram pelo local da picada ou ainda por qualquer outra solução de continuidade na pele (Figura 2). Uma vez ocorrida à penetração, os tripomastigotas interagem com células do sistema fagocítico mononuclear da pele ou mucosa. Após a entrada na célula hospedeira, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas em um período de 2 a 8 horas. Após um período de quietude, as amastigotas iniciam seu ciclo celular e passam por nove rodadas de replicação por divisão binária antes de se diferenciarem em tripomastigotas Após a diferenciação em tripomastigotas ocorre a ruptura da célula hospedeira. Dessa forma os tripomastigotas caem na corrente sanguínea ou invadem células de qualquer tecido ou órgão para a continuidade do ciclo. Os tripomastigotas sanguíneos podem infectar tanto células adjacentes como células em locais distantes. Qualquer célula nucleada de mamífero pode ser parasitada, como cardiomiócitos, células musculares, células do sistema nervoso central e periférico, sistema reticulo endotelial e tecido adiposo. (Coura, 2013; Machado *et al*, 2012; Epting *et al*, 2010).

O ciclo se fecha quando um novo triatomíneo realizar o repasto sanguíneo no indivíduo infectado e ingerir formas tripomastigotas sanguíneas (figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: O *T. cruzi* é naturalmente transmitido por inseto da triatomíneos. (a) Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca na pele do hospedeiro mamífero. (b) Os tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes penetra pela pele com solução de continuidade quando o hospedeiro mamífero coça o local da picada. (c) Os tripomastigotas invadem as células locais e se diferenciam em formas amastigotas, que são formas intracelulares replicativas. Após a replicação, ocorre nova diferenciação para as formas tripomastigotas e rompimento da células. (d) Após a ruptura, os tripomastigotas são liberados e (e) infectam novas células. (f) Alguns tripomastigotas retornam para a corrente sanguínea ou (g) colonizam os tecidos muscular e neural. (h) Durante o repasto sanguineo em um hospedeiro mamífero infectados, os insetos sugam os tripomastigotas senguíneas. (i) No intestino médio do inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que replicam por divisão binária e quando alcançam o reto, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, completando o ciclo.

Fonte: Adaptado de Macedo *et al*, 2002

Relação parasito-hospedeiro

Por ser um parasito digenético, as interações do *T. cruzi* com seu vetor (triatomíneos) e os hospedeiros vertebrados são fundamentais para a manutenção do seu ciclo biológico e sobrevivência.

Os triatomíneos são insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae e hematófagos em qualquer fase da vida e por ambos os sexos (Peterson *et al*,

2015; Santos, 2015; Carod-Artal e Gascon, 2010). Quando ingerem tripomastigotas durante seu repasto sanguíneo em mamíferos infectados, o ciclo do *T. cruzi* se inicia.

Depois de entrar no estômago dos triatomíneos junto com o sangue, os parasitos são confrontados com componentes da saliva (anticoagulantes que impedem a coagulação do sangue no estômago), enzimas digestivas e fortes mudanças como, temperatura, osmolaridade e fornecimento de nutrientes (Kollien e Schaub, 2000). O trato intestinal dos triatomíneos é dividido em intestino anterior, médio e posterior, que diferem na morfologia e função, expondo o parasito a microambientes diferentes (Guaneri *et al*, 2012).

Pelo fato dos triatomíneos serem hematóforos, o sangue continuamente está sendo digerido pela ação de proteases, liberando, assim aminoácidos, peptídeos e heme. O heme é usado como co-fator nutricional e em várias hemeproteinas essenciais para o parasito, porem, ele não possui uma via de biossíntese completa da molécula, precisando adquirir o heme do hospedeiro. Esse heme adquirido do triatomíneo é necessário para a proliferação dos epimastigotas (Guaneri *et al*, 2012).

A metaciclogênese (diferenciação da forma epimastigota não infecciosas para a tripomastigota metacíclico) é quase exclusivamente no reto e pode ser correlacionado com a fixação do parasito à parede retal e outros fatores que incluem o pH, a osmolaridade, soro do mamífero, componentes de hemolinfa, extratos de intestino, estresse metabólico, AMPc e ativadores de adenilato ciclase (Ávila *et al*, 2003; Kollien e Schaub, 2000).

Durante o repasto sanguíneo nos mamíferos, os triatomíneos defecam, liberando tripomastigotas metacíclicos nas fezes, que penetram no hospedeiro vertebrado através do ferimento proporcionado pela picada do vetor, iniciando sua jornada no hospedeiro vertebrado. Durante a picada do triatomíneo, este injeta saliva contendo trialisina, que tem capacidade de permeabilizar e lisar células procariontes e eucariontes, e lisofosfatidilcolina (LPC), que tem atividade anti-hemostática, impedindo a agregação plaquetária, induzindo a migração de macrófagos para o local da picada e bloqueando a produção de óxido nítrico (Guaneri *et al*, 2012) aumentando as chances de sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado.

Além dos componentes do próprio triatomineo que auxilia na sobrevivência e sucesso da infecção, o *T. cruzi* tem desenvolvido mecanismos complexos para assegurar uma invasão bem sucedida da célula hospedeira. Os aspectos da invasão celular variam entre os tipos celulares que incluem as interações superfície-superfície, eventos enzimáticos, sinalização mediada pelo cálcio, penetração do parasito na célula e fuga do vacúolo parasitóforo (Epting

et al, 2010). Os primeiros passos do processo de interação célula-hospedeira pode ser dividido em três fases: a adesão e reconhecimento, sinalização, e invasão (Souza *et al*, 2010)

Após a adesão do parasito à membrana da célula hospedeira, sinais moleculares são disparados por esta ligação, iniciando o processo de penetração em um vacúolo derivado de sua membrana (Dutra *et al*, 2010). As proteínas envolvidas na ligação com à célula hospedeira e invasão são as transsialidase e as mucinas, além das glicoproteínas de superfície. As transsialidases desempenham um papel importante na transferência do ácido siálico do hospedeiro, uma vez que o *T. cruzi* é incapaz de sintetizar o ácido siálico, isso permite a fixação, entrada e sobrevivência do parasito (Sibley, 2011)

Interações com células hospedeiras e a matriz extracelular ocorrer também, através de um grupo grande e diverso de glicoproteínas de superfície, como a gp82 e gp35/50, que são moléculas indutoras de sinalização através de Ca^{++}, e proteases. Os parasitos que penetram nas células de maneira dependente da gp82 (*T. cruzi* II), ativando uma cascata que envolve a fosforilação de tirosina, proteína quinase C, serina, liberando o Ca^{++} de reservatórios sensíveis ao inusitol-1,4,5-trifosfato (PI_3), já os parasitos que se ligam as células através da gp35/50 (*T. cruzi* I), a liberação do Ca^{++} de acidocalciossomos é via sinalização envolvendo adenilato ciclase e aumento do AMPc (Dutra *et al*, 2010; Epting *et al*, 2010). Em resposta a liberação de cálcio, ocorre o recrutamento de lisossomos perinucleares para o sítio de invasão, nesse local, lisossomos são incorporados imediatamente ao vacúolo parasitóforo (Dutra *et al*, 2010; Epting *et al*, 2010).

Tem-se descrito uma nova via de penetração na célula hospedeira independente do recrutamento de lisossomos, neste caso, a penetração do parasito ocorre através da invaginação da membrana plasmática que acumula fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3) (Dutra *et al*, 2010).

A exposição dos tripomastigotas ao ambiente ácido provocado pela fusão dos lisossomos ao vacúolo parasitóforo, é importante para a ativação da porina-*like* TcTOX que assumem conformação capaz de promover a lise do vacúolo para permitir a entrada do parasito no citoplasma, para a finalização do processo de diferenciação da forma tripomastigota em amastigota, que se inicia em pH baixo no interior no vacúolo (Dutra *et al*, 2010; Epting *et al*, 2010). Após um período de quietude, os amastigotas entram no ciclo celular e passam por replicações antes da diferenciação em tripomastigotas (Epting *et al*, 2010). Com o rompimento da célula, as tripomastigotas infectam células adjacentes ou mais distantes, podendo também infectar triatomíneos durante seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado.

Transmissão

A transmissão do *T. cruzi* ocorre de diversas formas. As mais comuns são a transmissão vetorial, a transfusão sanguínea e a congênita. As formas alternativas, como a transmissão oral e o transplante de órgãos e acidentes em laboratório são também importantes. Também são consideradas as formas excepcionais ou hipotéticas, como via sexual, através de outros vetores e uso comunitário de drogas injetáveis (Dias e Neto, 2011).

A transmissão vetorial é o mecanismo de transmissão de maior importância epidemiológica. A infecção ocorre pela penetração do tripomastigotas metacíclicos em solução de continuidade da pele ou mucosa (Neves *et al*, 2011).

A transfusão sanguínea é considerada o segundo mecanismo de importância epidemiológica para a transmissão do *T. cruzi*. Em grandes cidades esse mecanismo é de extrema importância, onde é alta a prevalência da infecção. O risco da aquisição da doença após uma transfusão está entre 10-20% dependendo de fatores como, concentração do parasito no sangue do doador, componentes do sangue transfundido e cepa do parasito. No Brasil, esse mecanismo de transmissão tem diminuído de importância, devido ao aperfeiçoamento dos bancos de sangue (Neves *et al*, 2011; Rassi Jr *et al*, 2010).

Outro mecanismo importante é por via congênita, que ocorre quando existem ninhos de amastigotas na placenta, onde ocorre a liberação de tripomastigotas que chegam a circulação fetal. A transmissão congênita ocorre em 5% das grávidas em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai. Em outros países endêmicos a taxa fica em torno de 1-2%. Essas diferenças podem ser atribuídas a cepa do parasito a fatores placentários e a metodologia usada para a detecção dos casos. Devido ao controle vetorial, essa via tem diminuindo progressivamente sua importância (Neves *et al*, 2011; Rassi Jr *et al*, 2010).

A transmissão oral pode ocorrer em diversas situações, como quando animais ingerem triatomíneos, canibalismos entre animais, ingestão de alimentos contaminados com fezes e urina de triatomíneos e durante a amamentação. Na região Norte do Brasil, a via oral tem grande importância, estando associada a microepidemias (Passo *et al*, 2012; Neves *et al*, 2011). Entre os anos de 1968 e 2007, foram registrados 592 casos de doença de Chagas na região amazônica brasileira, desses casos, 587 foram confirmados como doença de Chagas aguda, sendo 440 deles associados a surtos familiares. Em 2006, foram notificados 116 casos de doença de Chagas aguda em todo Brasil, sendo essa forma de potencial risco para a Saúde Pública (Passos *et al*, 2012). A região Norte contribui com a maior proporção dos casos de

transmissão oral entre os anos de 2000 e 2013 (91,1%), sendo o Pará, o estado que reúne a maior proporção dos casos 75% e mais de 50% apresentam inicio dos sintomas entre os meses de agosto e novembro, período que coincide com a safra de açaí no Pará (Ministério da Saúde, 2015). Passos e colaboradores (2012) demonstraram que o *T. cruzi* consegue sobreviver por 144 horas a 4°C na polpa de açaí *in natura*.

A transmissão do *T. cruzi* via transplante de órgãos tem sido bem documentado na América Latina e em áreas não endêmicas, como algumas regiões dos Estados Unidos da América e Canadá, e muitas partes da Europa. Essa via de transmissão pode desencadear a fase aguda grave, pois os receptores dos órgãos usam medicamentos imunossupressores, tornando-se mais suscetíveis a infecção. Os casos em regiões não endêmicas pode ser maior devido ao grande número de imigrantes originais de áreas endêmicas (Neves *et al* , 2011; Rassi Jr *et al*, 2010).

Os acidentes laboratoriais podem ocorrer entre pesquisadores e técnicos que manipulam o parasito em sangue de animais, vetores, pessoas infectadas e em cultura (Neves *et al*, 2011).

A transmissão via sexual já foi demonstrado de modo experimental, mas nunca em casos humanos (Neves *et al*, 2011).

Devido ao êxito no controle da transmissão da doença de Chagas via vetorial, o Brasil, recebeu em 2006, a certificação da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, concedida pela Organização Panamericana da Saúde (Ministério da Saúde, 2015).

Em 2015, o Ministério da Saúde emitiu um Boletim Epidemiológico evidenciando a ocorrência de casos da doença na fase aguda transmitidos principalmente pela via oral, além da prevalência de 0,02% de transmissão vertical, sendo que 60% das crianças confirmadas com a infecção pela via congênita eram do Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2015).

Esses dados mostram que a transmissão da doença no Brasil ainda é preocupante, não só pela ascensão da forma oral de transmissão, mas pelo surgimento de novos vetores como o *Pantrongylus megistus* que possui ampla distribuição geográfica no Brasil, é altamente suscetível a infecção por *T. cruzi*, e que vem se adaptando ao ambiente domiciliar.

Hospedeiro invertebrado (Triatomíneos)

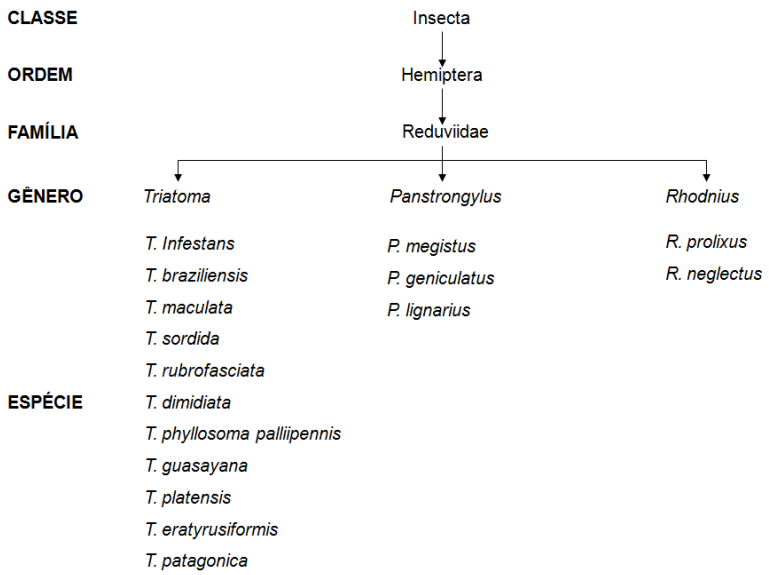
Os triatomíneos apresentam ampla distribuição em diferentes ecótopos naturais de regiões tropicais e subtropicais principalmente do continente americano (Figura 3). Os

triatomíneos são conhecidos popularmente como babeiro, bicho-de-parede, bicudo, chupão, chupança, entre outros. São hematófagos, apresentando um rostro retilíneo, um pouco mais longo que a cabeça, e acoplado à região gular, sob a cabeça, o aparelho bucal é do tipo picador-sugador. Os triatomíneos podem apresentar características importantes para a transmissão da Doença de Chagas, como (1) capacidade de domiciliação, (2) boa reprodução em ecótopos artificiais, (3) alta susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* e alta capacidade de metaciclogênese, (4) alto grau de antropofilia, (5) ingerstão de volumes significativos de sangue em curto tempo de repasto e (6) um curto intervalo entre repasto e defecação. (Ferreira, 2012; Coura, 2013; Rey, 2013).

Os triatomíneos têm porte relativamente grande, hematófagos restritos, eventualmente realizando canibalismo e coprofagia, desta forma podendo transmitir o *T. cruzi* de vetor para vetor. Tem vida relativamente longa (1-2 anos), apresentando ciclo de vida hemimetábolos típico, desde ovo, passando por cinco estágios ninfais e uma fase adulta, nesta surgindo as asas e completa diferenciação sexual (Dutra *et al*, 2010; Coura, 2013).

A maioria das espécies é silvestre, cultivando hábitos noturnos, alimentando-se enquanto seus hospedeiros estão dormindo e tendendo a voar pouco. A ingestão de sangue (10x seu peso em sangue) estimula a diurese e os triatomíneos esvaziam o seu conteúdo intestinal proveniente da alimentação anterior (Dutra *et al*, 2010; Coura, 2013).

Figura 3 - Classificação taxonômica da classe Insecta

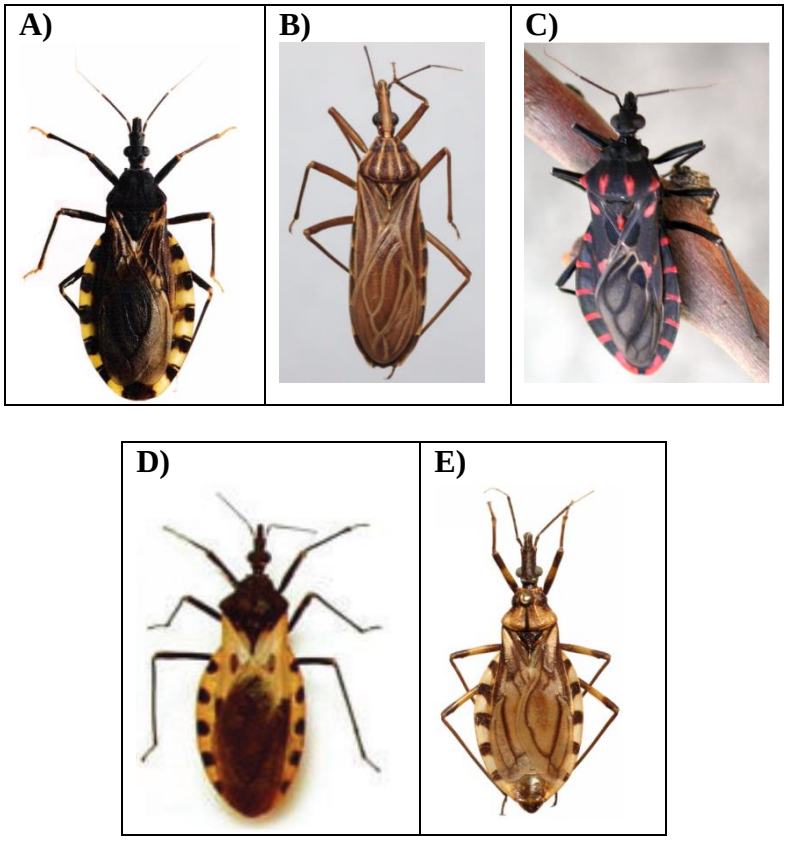


Fonte: Adaptado de Rey, 2013

Embora existam mais de 130 espécies de triatomíneos, apenas algumas são capazes de se infectar e transmitir o *T. cruzi*. As espécies de maior importância na transmissão da tripanossomíase americana para a população humana são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, e *Triatoma brasiliensis* (Figura 4) (Coura, 2013; Ferreira, 2012; Carod-Artal e Gascon, 2010).

A diferenciação entre os três gêneros pode ser feita comparando o posicionamento da inserção da antena em relação aos olhos do inseto. Em *Panstrongylus*, o tubérculo onde a antena é implantada localiza-se junto ao olho, já no gênero *Rhodnius* a antena é inserida na extremidade anterior do clípeo, longe do olho, por ultimo, no gênero *Triatoma*, a inserção da antena é localizada entre o clípeo e o olho do inseto (Ferreira, 2012).

Figura 4 – Principais vetores da doença de Chagas



Legenda: A) *Triatoma infestans* (Klug, 1834). B) *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859). C) *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). D) *Triatoma dimidiata*. E) *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911).
Fontes: Galvão e Gonçalves-Gurgel, 2014; Coutinho, 2013; Bellini, 2012.

A Tabela 2 apresenta as características e a distribuição das espécies mais importantes na transmissão da doença de Chagas.

Tabela 2 - Características e ocorrência das principais espécies transmissoras da doença de Chagas

Espécie	Característica	Ocorrência	Referência
Triatoma infestans	Adaptada ao domicílio humano, encontrada particularmente nas frestas das paredes de casas sem reboco, telhados de palha e atrás de caixas ou objetos que possa esconder-se durante o dia, por vezes é capaz de desalojar outras espécies quando invade as casas em novas áreas	Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru, Uruguai e Brasil. No Brasil, ocorria em todas as regiões. Após a implantação do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil, os focos estão restritos ao sudoeste do Piauí, sul de Tocantins, nordeste de Goiás, oeste da Bahia e nordeste do Rio Grande do Sul.	Panzera, 2014 Rey, 2013 Gurgel-Gonçalves, 2012 Dutra *et al*, 2010
Triatoma brasiliensis	Habita tanto ambientes domiciliares como silvestres. De controle difícil devido seu ambiente silvestre, geralmente próximo as casa e com alta densidade populacional	Nordeste brasileiro (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba), onde é freqüentemente o único triatomíneo encontrado no interior dos domicílios humanos. Amplamente distribuído na Caatinga.	Ferreira, 2012 Gurgel-Gonçalves, 2012 Dutra *et al*, 2010
Panstrongylus megistus	Ampla distribuição no território brasileiro e elevada suscetibilidade ao *Trypanosoma cruzi*, sendo domiciliar, peridomiciliar ou silvestre, dependendo da região.	Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Amplamente distribuídos por todo o Brasil, nas regiões de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. No sul, ele ocorre principalmente em ecótopos silvestres e no sudeste e nas áreas do nordeste.	Rey, 2013 Ferreira 2012 Gurgel-Gonçalves, 2012 Dutra *et al*, 2010
Rhodnius prolixus	Encontrado nos tetos de palhas das casas; habita o peridomicílio e os ecótopos naturais, como tocas e ninhos de tatus, pacas, ouriços e aves. Como seus ovos aderem ao substrato, aves podem ser importantes agentes de dispersão das espécies para grandes distancias, quando encontra-se habitando esses ninhos	Encontrada no México, América Central e América do Sul (Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil e Bolívia). Na Colômbia e Venezuela é uma espécie de grande importância, pois apresenta hábito doméstico, sendo que na Venezuela, chega a constituir 90% da população de triatomíneos capturados nas casas. No Brasil, pode ser encontrado na Região Amazônica	Rey, 2013 Dutra *et al*, 2010

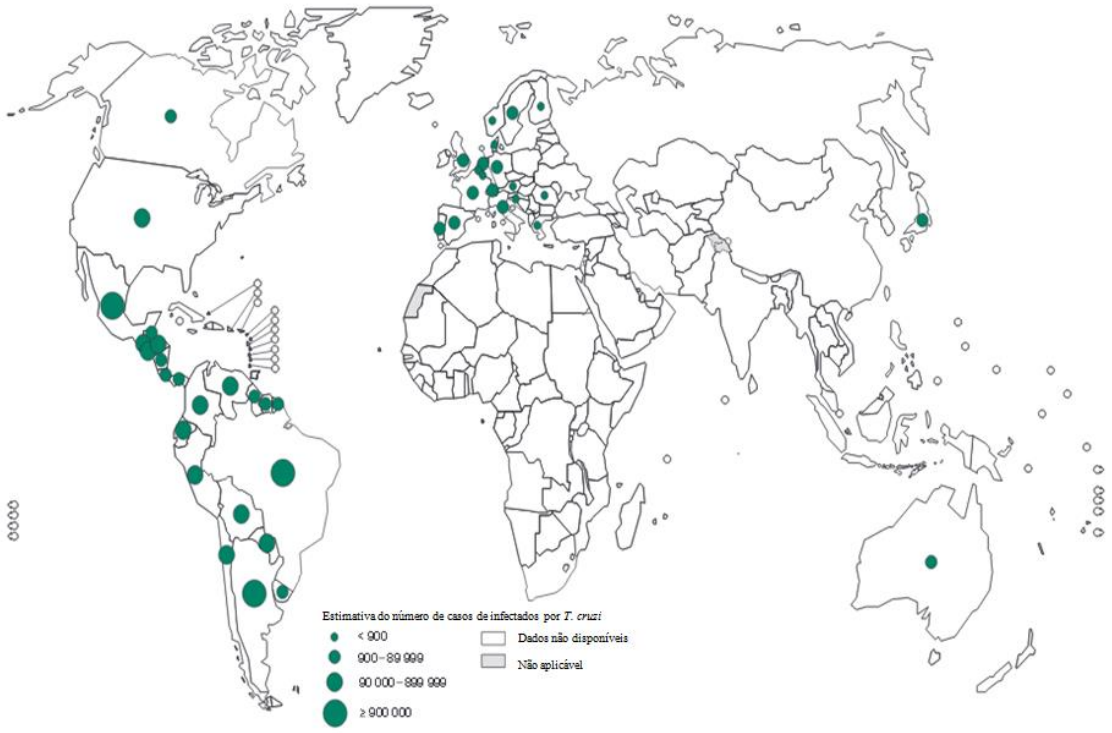
Epidemiologia

Cerca de 100 milhões de pessoas vivem em regiões onde os triatomíneos são detectados. A doença de Chagas é transmitida desde o sul do Texas (EUA), passando pelo México, América Central e América do Sul, incluindo países como Brasil, Venezuela, Colômbia, norte da Argentina e norte do Chile (Carod-Artal e Gascon, 2010).

Na década de 1980, o número de indivíduos infectados com *T. cruzi* em áreas endêmicas na América Latina foi estimado entre 16 a 18 milhões. Após a implantação de diversos programas de controle de vetores do parasito e rastreamento de bancos de sangues em regiões endêmicas, houve um declínio na prevalência de doença Chagas para cerca de 11 milhões de casos no final de 1990 e 7,6 milhões de casos em 2006 (Malik *et al*, 2015). Atualmente, estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina (Figura 5), podendo causar a incapacidade nesses indivíduos infectados e mais de 10 mil mortes por ano (WHO, 2016).

Por muitas décadas a doença de Chagas foi considerada uma doença de áreas rurais, porém com migrações rural-urbana em muitos países da América Latina nos últimos anos, o padrão epidemiológico mudou. A doença de Chagas também é uma doença emergente em países desenvolvidos, devido a migração de milhares de indivíduos infectados, muitos deles assintomáticos, para esses países. (Carod-Artal e Gascon, 2010). O transfusão sanguínea e o transplante de órgãos oriundos de indivíduos infectados pode servir de mecanismo de transmissão e propagação da doença, principalmente em países não endêmicos (WHO, 2016).

Figura 5 - Distribuição dos casos da doença de Chagas em todo mundo com estimativas oficiais de 2010-2013



Fonte: Adaptado de WHO, 2014.

Aproximadamente 12% da população do Brasil vive em áreas endêmicas e a prevalência nacional é estimada em 1,0% (Stanaway e Roth, 2015).

No ano de 2015, o Ministério da Saúde emitiu um Boletim epidemiológico dos casos de doença de Chagas aguda e da distribuição dos triatomíneos no Brasil entre os anos de 2000 e 2013. Entre os casos de doença de Chagas aguda confirmados, observou-se que a transmissão oral foi a mais frequente (68,9%) em todos os anos. Apesar de o Brasil ter recebido em 2006 a certificação da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infenstans*, ainda há registros de transmissão vetorial, porém em menor proproção (6,4%). Em relação a transmissão vertical, 50% dos registros ocorreram no estado do Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2015).

A região Norte contribui com a maior proporção dos casos de transmissão oral entre os anos de 2000 e 2013 (91,1%), sendo o Pará, o estado que reúne a maior proporção dos caso 75% e mais de 50% apresentam inicio dos sintomas entre os meses de agosto e novembro, período que coincide com a safra de açaí no Pará (Ministrério da Saúde, 2015).

Em relação a distribuição das espécies de triatomíneos no território brasileiro, foram identificadas 62 espécies habitando a áreas intra e peridomicílio. As espécies que apresentaram as maiores taxas de infecção foram *T. vitticeps* (52%), *R. robustus* (33,3%) e *P. lutzi* (29,4%), sendo que o *T. vitticeps* se apresenta com maior frequencia na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Ministério da saúde, 2015).

A Argentina tem a maior prevalência da doença de Chagas entre os países do sul da América Latina, onde 18,8% da população vive em áreas endêmicas e a prevalência estimada em 4,1%, porém muitos estudos relatam que em algumas comunidades a prevalência seja superior a 25%, na província de Chaco a prevalência foi estimada em 53%. O Chile e o Uruguai foram considerados a transmissão vetorial interrompida (Stanaway e Roth, 2015). A Tabela 3, apresenta a prevalência da doença de Chagas (DC) em outros países da América Latina.

Tabela 3 - Relação da percentagem da população de áreas endêmicas com a soroprevalência da doença de Chagas (DC).

Países	População de áreas endêmicas (%)	soroprevalência para DC (%)
Bolívia	31,5	6,8
Colômbia	10	1
Equador	46,9	1,7
México	27,6	1
Panamá	30,9	0,006
Peru	12,4	0,7
Venezuela	18,5	1,2

Fonte: Dados obtidos de Stanaway e Roth, 2015.

Patogenia

A doença de Chagas apresenta curso clínico bifásico, sendo dividida em fase aguda e fase crônica. A fase crônica pode ser dividida em forma crônica indeterminada e forma crônica sintomática. Após infecção há um curto período de incubação de 1 a 2 semanas, após esse tempo inicia-se a fase aguda, que dura normalmente 8 a 12 semanas. Cerca de 30% dos indivíduos infectados avança para a fase crônica sintomática, mas a maioria evolui para a fase crônica indeterminada (Malik *et al*, 2015).

A doença é observada geralmente, e em sua forma mais grave, em crianças com menos de cinco anos de idade, nas quais os sintomas de comprometimento do sistema nervoso central podem predominar. Em crianças mais velhas e adultos a doença ocorre, em geral, de forma mais branda, subaguda ou crônica (Markell *et al*, 2003).

A fase aguda caracteriza-se pela parasitemia patente (os tripanossomos são facilmente encontrados no sangue), reduzida resposta celular a antígenos de *T. cruzi* no teste intradermico e baixos títulos de anticorpos específicos da classe IgG (Ferreira, 2012). Nesta fase pode ocorrer várias manifestações clínicas, com sintomas inespecíficos, incluindo febre, dor de cabeça, mialgia, edema facial, dor abdominal, hepatoesplenomegalia e linfodenopatia. Os sintomas aparecem 1-2 semanas após a infecção, ou até alguns meses após a transfusão de sangue infectado. Uma pequeno número de pacientes podem apresentar o chagoma de inoculação, num nódulo inflamatório no local da inoculação, ou o sinal de Romanã (edema bipalperal e unilateral) (Figura 6). Durante essa fase os pacientes podem manifestar arritmias, nos casos mais graves, podem manifestar miocardite, meningoencefalite (Malik *et al*, 2015; Carod-Artal e Gascon, 2010; Rassi Jr *et al*, 2010). A morte ocorre ocasionalmente na fase aguda em cerca de 5-10% dos casos sintomáticos (Rassi Jr *et al*, 2010).

Figura 6 - Sinais no local de penetração do *T. cruzi*

A

B

Legenda: A) Sinal de Romaña (Fonte: Rey, 2013). B) Chagona de inoculação
Fonte: Adaptado de Sangenis *et al*, 2015.

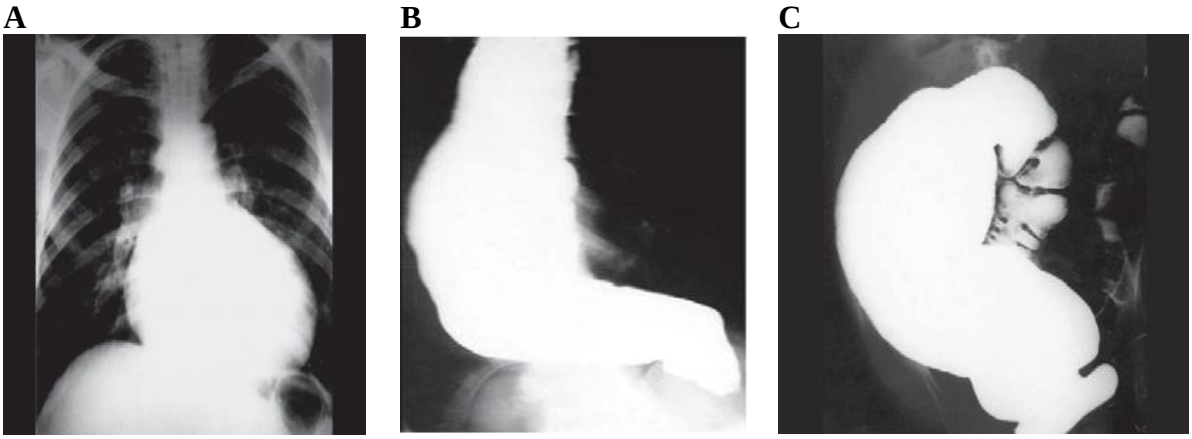
Após a fase aguda da doença, a maioria dos indivíduos entram na fase crônica indeterminada. A forma crônica indeterminada (latente) pode ser caracterizada por (1) positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos, (2) ausência de sintomas e/ou sinais

da doença, (3) eletrocardiograma normal e (4) imagem radiográficas normais do coração, esôfago e colón (Malik, 2015; Neves, 2011).

Dos pacientes infectados cerca de 20-30% progride da fase indeterminada para a fase crônica sintomática da doença, essa progressão pode ocorrer após, até 30 anos de infecção. Essa fase apresenta duas formas clínicas muito importantes pela frequencia em que ocorre, a forma cardíaca e a digestiva (Figura 7). A forma crônica mais frequente da doença é a cardiopatia, a qual está associada a dilatação do ventrículo esquerdo, aneurisma, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo, arritmias ventriculares e morte súbita. Cardiomiopatia chagásica tem elevado significativamente risco de acidente vascular cerebral (Malik *et al*, 2015; Carod-Artal e Gascon, 2010). Em, pelo menos, 10-20% dos pacientes, distúrbios gastrointestinais podem ocorrer, como megaesôfago e megacolón que pode provocar constipação crônica e desnutrição (Carod-Artal e Gascon, 2010)

A reativação da doença de Chagas pode ocorrer em pacientes infectados cronicamente que se tornaram imunologicamente comprometidos, como pacientes co-infectados com HIV ou que estão recebendo drogas imunossupressoras. Nesses pacientes pode ocorrer uma forma cerebral, observando--se geralmente meningoencefalite (Rey, 2013; Ferreira, 2012; Rassi Jr *et al*, 2010).

Figura 7 - Radiografias do coração, esôfago e cólon, representando as comorbidades da doença de Chagas na fase crônica



Legenda: A) Cardiopatia chagásica. B) Megaesôfago. C) Megacólon.
Fonte: Rassi Jr *et al*, 2010.

Cepa Y e Clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi constitui-se de cepas com comportamentos peculiares especialmente quando utilizados em modelos experimentais.

A cepa Y, pertencente ao grupo *T. cruzi* II (Zingales *et al*., 2009), foi isolada pelo dr. V. Nussenzweig de uma paciente japonesa ou descendente de japoneses. A paciente foi admitida em 1950 na Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas de São Paulo, com febre como manifestação dominante. Tanto a paciente quanto a filha (que apresentava febre), ambas oriundas de uma fazenda localizada na área rural de Marília (estado de São Paulo), foram diagnosticada com doença de Chagas na fase aguda. Os parasitos isolados desses pacientes mostraram peculiaridades que foram estudadas no Departamento de Parasitologia de Medicina de São Paulo. Estudos demonstraram sua virulência elevada, onde animais inoculados tiveram alta mortalidade, devido a isso, o protozoário obteve uma caracterização especial, recebendo a designação de cepa Y, primeira letra do nome da paciente mais nova. Após 25 anos, a paciente mais jovem não apresentou nenhuma manifestação ou distúrbio, apesar da cepa ter se mostrado extremamente virulenta em estudos experimentais (Neto, 2010).

Existe muita controvérsia quanto a virulência e tropismo dessa cepa, já sendo sugerido a existência de uma cepa Y mutante avirulenta (Menezes, 1971). Alguns trabalhos observaram parasitismo preferencial por fibras musculares lisas, esqueléticas e cardíacas, sendo baixo e transitório seu parasitismo no baço e fígado. Também já foi observado um intenso parasitismo e inflamação na bexiga, pâncreas e canal espermático (Souza e Alencar, 1984). Outro ponto de discussão é sobre seu intenso macrofagotropismo que foi observado em alguns trabalhos e em outros não (Souza e Alencar, 1984).

Pinto e colaboradores (1999) provaram pela primeira vez a presença das formas epimastigotas e amastigotas, juntamente com tripomastigotas da cepa Y no sangue circulante de camundongos Balb/c machos, além de demonstrar que a distribuição de ninhos de amastigotas no fígado e no baço é irregular.

O clone Dm28c, pertencente ao grupo *T. cruzi* I (Zingales *et al*., 2009), foi obtido através de micromanipulação de um isolado de gambá (cepa Dm28) por Goldenberg e colaboradores (1984). A fim de estudar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de genes no *Trypanosoma cruzi*, fez-se necessário o desenvolvimento de um clone para evitar

heterogeneidade populacional encontrado dentro de uma cepa. A cepa escolhida pelos autores do estudo foi a Dm28.

A cepa Dm28 foi isolada originalmente de uma espécie de gambá venezuelano (*Didelphis marsupialis*). Para a obtenção do clone, os tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28 foram diluídos em meio de cultura até a obtenção da concentração de um parasito por cinco microlitros e usados para infectar oralmente camundongos recém nascidos. Dessa infecção foram obtidos três clones com períodos de pré patencia de 8, 12 e 17 dias, definindo os clones de *T. cruzi* Dm28a, Dm28b e Dm28c, respectivamente. O clone Dm28c foi mantido em culturas axênicas em meio LIT e em triatomíneos com passagens entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Contreras *et al*, 1988).

As culturas axênicas de epimastigotas de Dm28c se mostraram similares as formas encontradas no hospedeiro invertebrado. Quando as formas epimastigotas do clone Dm28c foram incubadas em meio TAUP (Urina de Triatomíneo artificial suplementado com prolina) ou TAU3AAG (TAUP suplementado com glicose, ácido aspártico e glutamato de sódio) apresentaram uma alta diferenciação em tripomastigotas metacíclicos após seis dias de incubação, e estes, apresentaram propriedades similares aos tripomastigotas metacíclicos obtidos de excretas de triatomíneos (Goldenberg *et al*, 1984; Contreras *et al*, 1988).

As propriedades biológicas das formas tripomastigotas do clone não mudam de acordo com a proveniência delas (de triatomíneos, de camundongos infectados, de cultura celular ou meios TAUP e TAU3AAG) e os tripomastigotas provenientes do meio TAU3AAG apresenta alto grau de infectividade para fibroblastos e células musculares. Mostrando assim que clone Dm28c reproduz o comportamento biológico do *T. cruzi*, sendo apropriado para os estudos da interação parasito-célula e isolamento de macromoléculas (Contreras *et al*, 1988).

Tratamento

O tratamento da doença de Chagas limita-se no uso de dois fármacos disponíveis que são o nifurtimox (Figura 8A) e o benznidazol (Figura 8B). O nifurtimox é um derivado do nitrofurano produzido pela Bayer e o benznidazol é um derivado do nitroimidazol, que por muitos anos foi produzido pela Roche, porém ao parar a sua fabricação, a produção do fármaco foi transferido para o governo brasileiro associado a empresa farmacêutica,

Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes- LAFEPE (Barrett e Croft, 2012) .

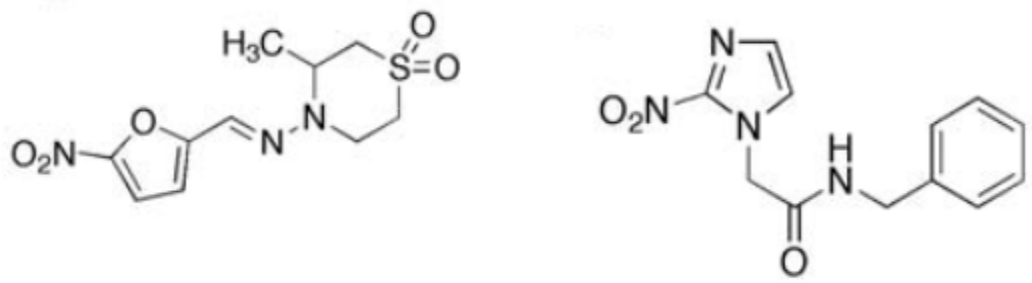
O nifurtimox, 5-nitrofurano [3-metil-4-(5'-nitrofurfurildienoamina) tetrahidro-4H-1,4-tiazi-1,1-dióxido], comercializado pela Bayer com o nome comercial de Lampit, foi introduzido para tratar a doença de Chagas na fase aguda na década de 1960. O fármaco é tripanomicida tanto para as formas tripomastigotas circulantes como para amastigotas (Bermudez *et al*, 2016; Barrett e Croft, 2012). Tem sido a principal terapia contra doença de Chagas nos Estados Unidos (Bermudez *et al*, 2016). O nifurtimox possui meia-vida curta (3 horas) e a potência tripanossomicida é fraco e por isso a droga é administrada por períodos prolongados (Barrett e Croft, 2012).

O mecanismo de ação do nifurtimox está baseado na formação de um radical nitroânion ($R\text{-}NO_2^-$), pela ação de nitroredutases do citocromo p450 dependentes de NADPH, gerando um ciclo redox com a formação de íon superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies reativas de oxigênio na presença de Fe^{3+} formam o radical livre hidroxil (OH^-), que pode ligar-se a proteínas, a lipídeos e ao DNA, provocando perda de função, gerando danos que comprometem a vida do parasito (Dutra *et al*, 2010). As diferentes linhagens de *T. cruzi* mostram diferenças significativas na suscetibilidade ao fármaco, possivelmente por causa de diferentes níveis de enzimas nitroredutase necessários para a ativação de expressão (Barrett e Croft, 2012).

O outro medicamento usado no tratamento da doença de Chagas é o benznidazol, N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamina, introduzido na década de 1970, tem atividade variável em diferentes cepas de *T. cruzi* (Barrett e Croft, 2012). O mecanismo de ação desse fármaco está baseado principalmente na inibição das funções de diferentes macromoléculas, principalmente enzimas e lipídeos, devido à ligação covalente entre essas e os metabólitos reduzidos derivados do benznidazol. O benznidazol também é capaz de aumentar a atividade fagocítica, a atividade tripanomicida do interferon gama e promover a inibição da fumarato redutase NADPH-dependente do *T. cruzi* (Dutra *et al*, 2010).

Figura 8 - Estrutura química dos fármacos utilizados contra a doença de Chagas

A **B**



Legenda: A) Nifurtimox; B) Benznidazol.
Fonte: Barrett e Croft, 2012

Esses fármacos utilizados no tratamento de pacientes acometidos com a doença de Chagas apresentam diversos efeitos colaterais. Já foram relatados efeitos tóxicos do nifurtimox para o sistema nervoso central e periférico, anorexia, perda de peso, excitabilidade ou perda de sono. Problemas gastrointestinais como náuseas, cólicas estomacais, vômitos e diarréia são comuns (Barrett e Croft, 2012; Salas *et al*, 2011; Dutra *et al*, 2010). A baixa solubilidade do benznidazol combinada uma alta dose por longo tratamento, o que pode causar diversas manifestações cutâneas como, hipersensibilidade cutânea, dermatite com erupções, além de anorexia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, congestão, vertigem e as manifestações mais graves incluem depressão de medula óssea e sistema nervoso central, trombocitopênia e agranulocitose (Bermudez *et al*, 2016; Salas *et al*, 2011; Dutra *et al*, 2010). Estudos experimentais de toxicidade do nifurtimox evidenciaram danos testiculares, toxicidade do ovário e efeitos deletérios na glândula adrenal, no cólon, esôfago e tecido mamário. Já no caso do benznidazol foram observados efeitos deletérios na supra-renal, cólon e esôfago, além de inibir o metabolismo de vários xenobióticos biotransformados pelo sistema do citocromo P450 (Salas *et al*, 2011).

Apesar dos diversos efeitos colaterais apresentados pelos dois fármacos, o tratamento tripanossomicida é altamente recomendado para todos os casos de doença de Chagas na fase aguda, congênita e para pacientes de até 18 anos com a doença na fase crônica. Esse tratamento é contra indicado durante a gravidez e em pacientes com deficiência renal grave ou insuficiência hepática. Por apresentar o melhor perfil de segurança e eficácia, o benznidazol está sendo utilizado como primeira escolha no tratamento da doença de Chagas (Rassi Jr *et al*, 2010).

O regime de tratamento recomendado para o uso do nifurtimox é que na fase aguda ou casos congênitos da doença de Chagas, utiliza-se 8-10 mg/ Kg/ dia, divididos em duas a três doses por dia, durante 30 a 60 dias consecutivos e para as infecções crônicas recentes ou indivíduos infectados nos últimos 10 anos, deve ser de 8 mg/ Kg/ dia durante 30-60 dias, podendo se prolongar por até cinco meses ou mais em pacientes reincidentes ou imunocomprometidos. Em crianças a dose pode chegar a 15 mg/ Kg/ dia, divididos em três dose por dia, durante 60 a 90 dias (Bermudez *et al*, 2016; Dutra *et al*, 2010; Rassi Jr *et al*, 2010).

Já para o uso do benznidazol, o recomendado é que na fase aguda ou casos congênitos da doença de Chagas, utiliza-se 5-7,5mg/Kg/dia, divididos em duas a três doses por dia, durante 30 a 60 dias consecutivos e para as infecções crônicas recentes ou indivíduos infectados nos últimos 10 anos, deve ser de 5 mg/ Kg/ dia durante 30-60 dias. Em crianças a dose pode chegar a 10 mg/ Kg/ dia, dividido em duas ou três doses, durante até 60 dias (Bermudez *et al*, 2016; Dutra *et al*, 2010; Rassi Jr *et al*, 2010). Devido à baixa solubilidade que afeta a sua biodisponibilidade, o benznidazol apresenta pouca ação contra formas intracelulares do parasito e, portanto, pouca eficácia na fase crônica da doença (Bermudez *et al*, 2016);

Tabela 4 - Características do Benznidazol e Nifurtimox

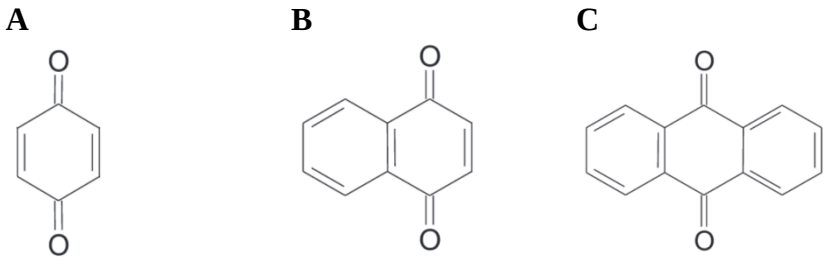
Fármaco	**Benznidazol**	**Nifurtimox**
Mecanismo de ação	Inibição das funções de diferentes macromoléculas (enzimas e lipídeos)	Geração de ciclo redox com formação de íon superóxido e peróxido de hidrogênio
Recomendação	Todos os casos de doença de Chagas na fase aguda, congênita e para paciente de até 18 anos com a doença na fase crônica	
Contra indicação	Gravidez, pacientes com deficiência renal grave ou insuficiência hepática	
Administração	5-7,5mg/Kg/dia, divididos em duas a três doses por dia, durante 30 a 60 dias consecutivos; Crianças: 10 mg/Kg/dia, dividido em duas ou três doses, durante até 60 dias	8-10 mg/Kg/dia, divididos em duas a três doses por dia, durante 30 a 60 dias consecutivos; Crianças: 15 mg/Kg/dia, divididos em três dose por dia, durante 60 a 90 dias
Efeitos Adversos	Hipersensibilidade cutânea, dermatite com erupções, anorexia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, congestão, vertigem, depressão de medula óssea e sistema nervoso central	Efeitos tóxicos para o sistema nervoso central e periférico, anorexia, perda de peso, perda de sono, problemas gastrointestinais (náuseas, cólicas estomacais, vômitos e diarréia)

Recentemente, estudos têm sido conduzidos para avaliar o impacto do tratamento com o benznidazol na fase crônica. Em um estudo com pacientes de 49 centros no Brasil, Argentina, Colômbia, Bolívia e El Salvador, com a cardiopatia estabelecida, o tratamento com benznidazol foi capaz de reduzir os parasitos sanguíneos, mas não foi capaz de alterar o curso do dano cardíaco (Morillo *et al*, 2015).

Quinonas, Naftoquinonas e Pterocarpano

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Na natureza estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, como, nos níveis da cadeia respiratória e da fotossíntese (ubiquinonas e plastoquininas) e ação controladora da coagulação sanguínea desempenhado pela vitamina K, que é uma naftoquinona. As quinonas naturais são vitais para liquens, algas, bactérias, fungos, artrópodes e vegetais superiores. Com base na estrutura molecular, as quinonas são divididas em três diferentes grupos de acordo com o anel quinonoídica (Figura 9): Benzoquinonas (um anel benzênico), Naftoquinonas (um anel naftalênico) e Antraquinonas (um anel antracênico linear ou angular) (Silva *et al*, 2003).

Figura 9 - Classificação das quinonas



Legenda: A) Benzoquinona. B) Naftoquinona. C) Antraquinona.
Fonte: Adaptado de Silva *et al*, 2003.

As naftoquinonas são amplamente distribuídos no reino vegetal. Suas estruturas moleculares fornecem propriedades redox, que podem interferir em processos oxidativos. O

lapachol e a β-lapachona são naftoquinonas bioativas, encontradas em plantas da família Bignoniacea, particularmente do gênero *Tabebuia* que são abundantes na região tropical (Menna-Barreto *et al*, 2009; Silva *et al*, 2003)

A β-lapachona tem sido encontrada como constituinte minoritário durante o isolamento de outras naftoquinonas, porém mostra uma diversificada ação farmacológica (Silva *et al*, 2003) e tem sido o objeto de intensa investigação como um composto potencial para a terapia do câncer, uma vez que o seu efeito citotóxico é associada a topoisomerases e inibição da apoptose. A atividade tripanomicida de β-lapachona está relacionada com a geração de radicais livres e inibição de biossíntese de macromoléculas. O tratamento das três formas evolutivas de *T. cruzi*, com esta naftoquinona conduz alterações sugestivas de apoptose (Menna-Barreto *et al*, 2009). Moléculas deviradas da β-lapachona, como naftoimidazoles e naftofuranoquinona, demonstram efeitos em *T. cruzi*. Os naftoimidazoles são ativos nas três formas evolutivas de *T. cruzi*, com autofagia como um dos possíveis mecanismo de ação, sendo a via endolítica seu principal alvo (Menna-Barreto *et al*, 2007), já os naftofuranoquinona tem ação *in vitro* sobre epimastigotas, tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares, com aumento de produção de ROS e danos graves à mitocôndria (Menna-Barreto *et al*, 2009).

O lapachol (2-hidroxi-3-(e-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) é extraído do Ipê roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor, Bignoniácea). Isolado primeiramente por Partenó em 1886, tendo sua estrutura química estabelecida desde 1896, por Hooker. O principal interesse no lapachol consiste em sua capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, ânion-radical superóxido e o radical hidroxila. Já foram comprovadas diversas atividades biológicas e farmacológicas do lapachol e seus derivados tais como a ação citostática (contra diversos tumores), antiviral, bacteriostática, fungistática, cercaricida, moluscicida (atividade contra caramujos *Biomphalaria glabrata*), leishmanicida (ação nas formas amastigotas intrcelulares de *Leishnania* (*V.*) *braziliensis*) tripanomicida (ação nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*), antitérmica, antimalárico (atividade contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*), efeitos anticoagulantes por inibição da enzima envolvida na bioquímica da vitamina K, atividade anti-inflamatória (Hussain *et al*, 2007; Silva *et al*, 2003; Araujo *et al*, 2002; Oliveira *et al*, 1990).

O mecanismo de ação das quinonas e seus derivados está relacionado a sua capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células. As estruturas desses compostos participam do ciclo redox mitocondrial, pela ação de enzimas, forma-se um ânion semiquinona que é

catalisado pelas enzimas NADPH citocromo P450 redutase e NADPH citocromo b5 redutase. Quando ocorre a formação da semiquinona, esta reduz o oxigênio molecular em ânion-radical superóxido, que na presença da enzima superóxido dismutase, é transformado em peróxido de hidrogênio. O ânion-radical superóxido, por catálise com metais de transição ou reação com o peróxido de hidrogênio, gera o radical hidroxila no interior da célula, sendo estas as espécies principais responsáveis por gerar o estresse oxidativo na célula (Silva *et al*, 2003).

Os pterocarpanos são compostos naturais que tem um anel tetracíclico derivado de um esqueleto de um isoflavonoide base e uma ligação éter. Estudos com pterocarpanos como o 2,3,9-trimetiloxipterocarpano mostrou que ser capaz de bloquear o ciclo células de câncer de mama pela inibição da separação dos fusos durante a mitose (Militão *et al*, 2014). O aza-deoxi-pterocarpano mostrou ser ativo contra células de linhagem leucêmica pela indução de apoptose (Buarque *et al*, 2014).

Devido ao grande potencial das naftoquinonas e dos pterocarpanos, foram desenvolvidas moléculas juntando esses dois componentes, as pterocapanoquinonas. Entre essas moléculas estão a LQB-118 (Costa, 2009).

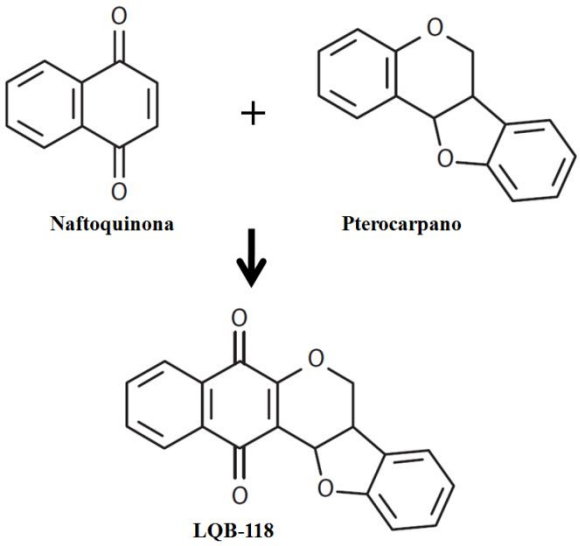
LQB-118

A pterocarpanoquinona LQB-118 é uma molécula sintética produzida pela hibridização de uma naftoquinona (lapachol) com uma pterocarpano (Figura 10). Ao longo de diversos trabalhos, a LQB-118 está se mostrando uma molécula promissora, com ação antitumoral e antiparasitária. Entre as atividades observadas destacam-se a capacidade de indução de morte celular por apoptose. A molécula reduz a viabilidade em células de linhagem de leucemia mielóide crônica (LMC), tanto em células sensíveis quanto resistentes à medicamentos antineoplásicos, induz apoptose em células de pacientes com LMC (Maia *et al*, 2011) e em linhagem celular de leucemia aguda. Foi observado também aumento de cálcio em ambas as linhagens e despolarização da membrana mitocondrial nas células de linhagem de LMC (Sá Bacelar *et al*, 2013). A LQB-118 também induz apoptose em células de linhagem de leucemia mielóide aguda por inibição de inibidores de apoptose (Souza Reis *et al*, 2013). Além das linhagens de células de leucenia mielóide aguda e crônica, foi visto *in vitro*, a ação da LQB-118 levando a inibição da proliferação e indução de apoptose em células de câncer de próstata (Martino *et al*, 2014)

Os efeitos antiparasitários da LQB-118 foram vistos contra *Toxoplasma gondii* provocando alteração morfológicas e conversão dos taquizoítos em bradizoítos (Portes *et al*, 2012). Em *Leismania amazonensis,* a LQB-118 induz morte por apoptose e diminuição da produção de ATP em promastigotas. Em amastigotas foram vistos aumento da produção de ROS nas primeiras horas de incubação com a molécula e fragmentação do DNA (Ribeiro *et al*, 2013). Em macrófagos infectados reduziu o número de amastigotas, em Balb/c infectados com *L. amazonensis* a administração pela via oral é capaz de diminuir a lesão e a carga parasitária (Cunha-Júnior *et al*, 2011). Resultados semelhantes foram observados pelo nosso grupo em estudos com *L. braziliensis,* com aumento da produção de ROS, redução de ATP, sugerindo disfunção mitocondrial e indução de apoptose em promastigotas. Quando administrada por via oral ou intralesional, a LQB-118 diminui significativamente o tamanho da lesão e a carga parasitária em hamster infectados com *L. braziliensis* (Costa *et al*, 2014).

Devido ao grande espectro de ação da peterocarpanoquinona LQB-118 abrangendo atividade antitumoral e antiparasitária, sobretudo em duas diferentes espécies de *Leishmania*, nosso grupo iniciou um estudo da ação da molécula em *Trypanosoma cruzi*. Um vez que os únicos medicamentos disponíveis para tratar a doença de Chagas são tóxicos e tem sua eficácia limitada à fase aguda da doença, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas é prioritário.

Figura 10 - Estrutura química da LQB-118 e de seus precursores



Fonte: Adaptado de Cunha-Júnior *et al*, 2011

1 **OBJETIVO**

1.1 **Geral**

O presente trabalho tem como objetivo investigar o mecanismo de ação da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre formas epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e seu potencial terapêutico na fase aguda da doença de Chagas experimental.

1.2 **Específicos**

Avaliar a atividade sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (clone Dm28c) determinando a IC_{50} (dose inibitório de 50%).

Avaliar a cinética de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por LQB-118 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (clone Dm28c).

Avaliar ultraestrutural de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118.

Avaliar preditiva de parâmetros toxicológicos *in silico*.

Avaliar o potencial terapêutico da LQB-118 administrada pela via oral na fase aguda da doença de Chagas em modelo murino.

2 **MATERIAL E MÉTODOS**

Considerações éticas

Todos os procedimentos com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para cuidados e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ Protocolo n° CEUA/027/2013

2.1 **LQB-118**

A síntese da pterocarpanoquinona LQB-118 foi realizada pelo grupo do profº Paulo Roberto Ribeiro Costa do Laboratório de Quimica Biorgânica (LQB) do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A LQB-118 liofilizada foi solubilizada em DMSO (Sigma- Aldrich) a partir da qual foram feitas diluições em meios de cultura para uso nos experimentos. A concentração final máxima de DMSO nas culturas de células não ultrapassou 0,02%.

2.2 **Parasito**

Neste trabalho foram utilizados cepa Y e clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. Ambos foram cedidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Marcia Cristina Paes (Laboratório de Interação de Tripanossomatídeos e Vetores – IBRAG/UERJ/RJ).

2.3 **Cultivo do clone Dm28c**

Os epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram mantidos por repiques semanais em garrafas contendo 5 mL de meio BHI (Bacto Brain Heart Infunsion) (Becton, Dickinson and Company) com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab) e estéril, na presença de 30µM de Hemina Bovina (Sigma - Aldrich) e cultivados em estufa a 27°C.

2.4 **Cultivo e manutenção da cepa Y**

As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas sistematicamente de camundongos *Swiss* após sete dias de infecção.

Após a eutanásia, em câmara de gás carbônico (CO_2), foi realizada a punção cardíaca utilizando uma seringa contendo 0,5mL de citrato de sódio (Sigma - Aldrich). O sangue obtido foi injetado em camundongos *Swiss* normais por via intraperitoneal (0,2mL/animal). O volume de 0,2 ml de sangue continha aproximadamente 10^5 tripomastigotas sanguíneos.

Para a obtenção de massa do parasito, camundongos *Swiss* infectados com 10^5 tripomastigotas foram imunossuprimidos após 48h da infecção com 8mg/Kg/animal de Ciclofosfamida monoidratada (Baxter). No 7º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados e o sangue obtido por punção cardíaca utilizando uma seringa contendo 1mL de citrato de sódio, foi acondicionado em tubos criogênicos com rosca externa, homogeneizado e centrifugados a 255g por 22 minutos a 24°C. Após a centrifugação, os tubos foram colocados em estufa à 37°C por 20 minutos. Passado esse tempo, o plasma foi coletado e centrifugado à 2459g por 15 minutos à 24°C e o sobrenadante foi descartado (Adaptado de Meirelhes *et al*, 1982). O sedimento contendo os parasitos foi ressuspenso em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. Os tripomastigotas foram contados na câmara de Neubauer e ajustados para a concentração necessária para o uso nos experimentos.

2.5 **Avaliação da atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c**

Formas epimastigotas cultivadas como descrito no item 2.3 foram obtidas após sete dias de cultura em meio BHI, contadas e ajustadas para 1 x 10^6 células. Em uma placa de 24

poços foi colocado 500µL de meio BHI e 20% de soro fetal bovino (SFB) contendo 1 x 10^6 epimastigotas aos quais foi adicionado 500µL de meio BHI contendo a LQB-118 (0-5µM). Para os grupos controle foram utilizados parasitos cultivados com meio BHI na ausência ou presença de DMSO 0,003%. A incubação foi feita em estufa de 27°C por 96 horas. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer.

Para avaliação da ação da LQB-118 sobre a morfologia das formas epimastigotas, os parasitos foram colhidos após 96 horas de interação com o fármaco, centrifugados (2655 g por 3 minutos à 26°C) e finalmente ressuspensos em PBS. Uma alíquota da suspensão de parasito (10µL) foi retirada e colocada em uma lâmina. Os esfregaços feitos nas lâminas foram corados com Panótico (Laborclin), observados e então fotografados em microscopia de luz.

2.6 **Efeito da LQB-118 na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c**

Primeiramente foi realizada uma curva de produção de ROS pelos parasitos tratados com diversas concentrações da LQB-118 (0-20µM) em diferentes tempos que variaram de 30 minutos à 48 horas. Após o tempo de tratamento, os epimastigotas foram reajustados pra a concentração de 1x10^7 parasitos/mL, lavados com PBS (Tampão Fosfato de Sódio 100mM + NaCl 150mM) à 25°C e adicionado 2µM da sonda DHE (Dihidroetídio) (Invitrogen Life Science) por 30 minutos em câmara escura. O controle positivo representa as células que foram tratadas por 30 minutos com o peróxido de hidrogênio (100µM), e o controle negativo aquelas tratadas ou não com DMSO (concentração máxima de 0,02%). Após o tempo de marcação da sonda, foi realizada a quantificação da fluorescência, utilizando o citômetro de fluxo BD FACSCalibur (localizado no Laboratório de Biologia do Câncer, Departamento de Biofísica e Biometria, IBRAG, UERJ).

Depois de definir o melhor tempo e concentrações de LQB-118, foram realizados novos testes. Epimastigotas foram contados e reajustados para a concentração de 1x10^7 células/mL, lavados com PBS (Tampão Fosfato de Sódio 100mM + NaCl 150mM) à 25°C. As células foram pré-incubadas com 10nM do antioxidante mitocondrial MitoTEMPO (2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2- oxoethyl) triphenylphosphonium (Enzo Life Science) por 30 minutos em câmara escura. Após a incubação, os parasitos foram incubados na ausência oupresença da LQB-118 (10µM ou 20µM) ou tratadas ou não com

2µg/mL Antimicina A (Sigma-Aldrich) e adicionado ou não 2µM do marcador DHE por 30 minutos. Após isso, foi realizada a quantificação da fluorescência, utilizando o citômetro de fluxo BD FACSCalibur.

A fim de avaliar-se uma eventual autofluorescência da LQB-118 não estivesse interferindo nos resultados. Analisamos emissão de fluorescência da molécula sozinha nos comprimentos de onda que variaram de 220-800nm utilizando o espectrofotômetro de fluorescência F-300 Hitachi (Departamento de Bioquímica, IBRAG, UERJ). Foram avaliados: (1) LQB-118 10µM; (2) LQB-118 10µM + DHE (2µM); (3) LQB-118 10µM + Mito-TEMPO (2µM); (4) LQB-118 10µM + DHE (2µM) + Mito-TEMPO (2µM); (5) LQB-118 20µM; (6) LQB-118 20µM + DHE (2µM); (7) LQB-118 20µM + Mito-TEMPO (2µM) e (8) LQB-118 10µM + DHE (2µM) + Mito-TEMPO (2µM). Tanto os comprimentos de onda de emissão e excitação foram analisados.

2.7 **Análise ultraestrutural de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118**

A fim de verificar se o tratamento com a molécula LQB-118 provocaria alterações ultraestruturais que poderiam levar a morte do parasito, foi realizado a microscopia eletrônica de transmissão.

Epimastigotas ($1x10^7$/mL) de *T. cruzi* (Dm28c) foram tratadas ou não com LQB-118 (0-2µM) por 24h/27ºC. Após esse tempo, as células foram centrifugadas (2655g por 3 minutos à 26°C) e lavadas com PBS estéril a 27°C. As amostras foram fixadas com a solução de glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M por 2h/4°C, e em sequência lavadas três vezes com tampão cacodilato (a cada lavagem as amostras ficaram 10 minutos em descanso para depois serem centrifugadas à 2655g por 3 minutos à 26°C).

Após as lavagens, a pós-fixação das amostras foi realizada utilizando solução de 1% de tetróxido de ósmio (EMS) e 0,8% de ferrocianeto de potássio (EMS) por 40 minutos em câmera escura, na capela de exaustão, depois foram lavadas com água destilada e iniciada a etapa de desidratação das amostras, com concentrações crescente de acetona (Vetec), 30%, 50%, 70%, 90% e absoluto (duas vezes), por 10 minutos e centrifugadas (2655g por 3 minutos à 26°C) a cada etapa.

Finalizada a etapa de desidratação, as amostras foram incluídas em resina epóxi (Epon) (Polysciences) de forma gradativa nas proporções de 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3 (acetona:resina), e ao final em resina pura. As amostras foram colocadas em um homogeneizador de tecido (Kasvi), cada etapa durou entre 6-8 horas, sendo que etapa com resina pura durou 24 horas. As amostras foram transferidas para moldes e colocadas em uma estufa a 60°C por 72 horas, para ocorrer a polimerização da resina.

Os blocos com as amostras foram cortados no ultramicrôtomo (Leica EM UC6), localizado na Unidade de Pesquisa Urogenital do Departamento de Anatomia, IBRAG, UERJ. Os cortes, com espessura de 60-70nm, foram coletados em grades de cobre (diâmetro de 3mm). A contrastação dos cortes foi feito com 5% de acetato de uracila (EMS) por 20 minutos e com citrato de chumbo (Merck) por 3 minutos.

Os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900, localizado no Centro Nacional de Bioimagem, UFRJ.

Os cortes, contrastação e análise foram feitos nas amostras, epimastigotas tratadas com 0,002% de DMSO (controle) e epimastigotas tratadas com LQB-118 (2µM).

2.8 **Análise de parâmetros toxicológicos *in silico***

O programa ADMETSar (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), permite realizar uma avaliação preditiva *in silico* de diversos parâmetros farmacocinéticos das moléculas. A avaliação preditiva da molécula LQB-118 foi realizada anteriormente por Cunha-Junior, onde foi avaliado os parâmetros de absorção através da barreira hematoencefálica, absorção intestinal humana e permeabilidade para células CaCo-2 e de metabolização (ser substrato ou inibidor) de enzimas do complexo citocromo P450. Nesse trabalho será realizado a análise de parâmetros de toxicidade como, inibição do gene hERG; carcinogênese e a toxicidade oral aguda.

2.9 **Ensaio *in vivo***

2.9.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* de ambos os gêneros, com idade entre 4 a 6 semanas, pesando de 20 a 30 gramas, mantidos no biotério da Disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais ficaram em gaiolas plásticas, em sala especial, com renovação constante do ar, sob temperatura controlada (21±2°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentação com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

2.9.2 Infecção experimental

2.9.2.1 Ensaio 1 (Piloto)

Esse ensaio foi conduzido seguindo o desenho experimental da figura 11. Foram infectados 14 animais de ambos os gêneros, por via intraperitoneal com 10^3 de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y (obtidos como descrito no item 3.4).

Após 7 dias de infecção, a parasitemia foi avaliada. Dos 14 animais infectados, 12 animais apresentaram parasitemia positiva e foram usados no experimento.

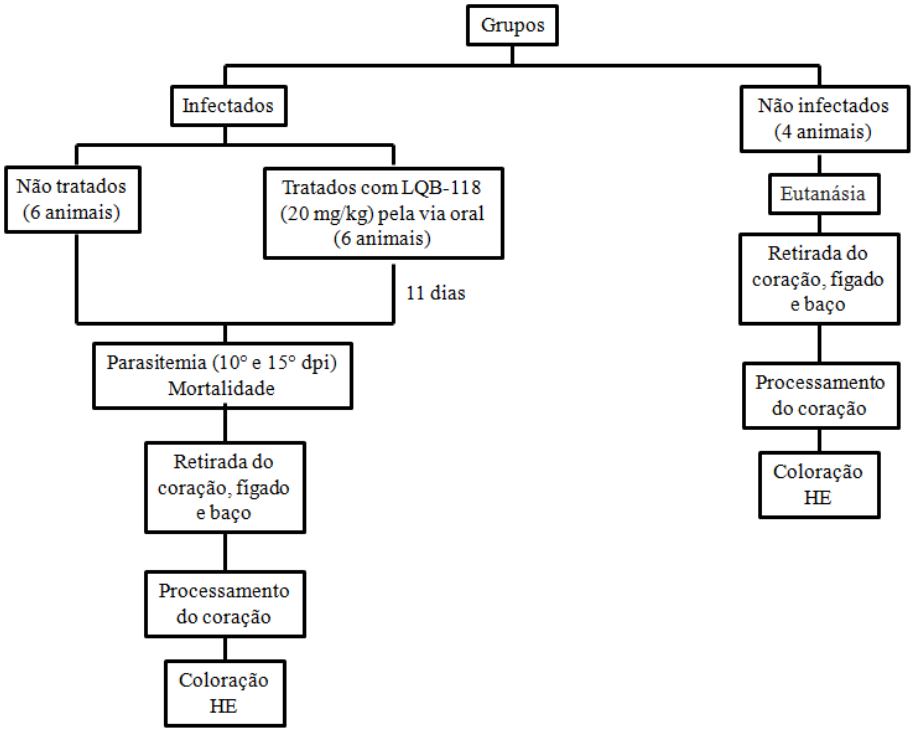
Neste experimento piloto, os animais foram divididos em 3 grupos: (1) Animais infectados e não tratados (n=6); (2) Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg/animal) pela via oral (n=6) e (3) Animais não infectados e não tratados (n=4).

Para realizar o tratamento oral, 25mg de LQB-118 foi solubilizada em 50 µL de DMSO (Sigma - Aldrich) e posteriormente solubilizada em 5 mL de ORA-Plus (Perrigo®), que é um veículo de base aquosa. Cada animal tratado recebeu 100µL dessa solução (LQB-118 + DMSO + ORA-Plus) uma vez ao dia (20mg/Kg/dia) a partir do 7º dia pós-infecção por 11 dias consecutivos.

A parasitemia foi realizada no 10º e 15º dpi (dias pós infecção). Os animais que vieram a óbito ao longo do experimento foram pesados e o coração, baço e fígado foram removidos, lavados em solução salina 0,9%, secos em papel filtro, pesados e fixados em formol tamponado 10%. Após 24 horas, a solução de formol era trocado. O coração dos

animais foi processado e submetido às coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). Os animais não infectados foram eutanasiados e submetidos ao mesmo procedimento descritos anteriormente, como indicado na figura 11.

Figura 11 - Desenho experimental do ensaio *in vivo* 1(piloto)



2.9.2.2 Ensaio 2

O segundo ensaio *in vivo* foi realizado usando o protocolo descrito na figura 12. Foram infectados 19 camundongo machos, por via intraperitoneal, com 10^3 de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y (obtidos como descrito no item 3.4).

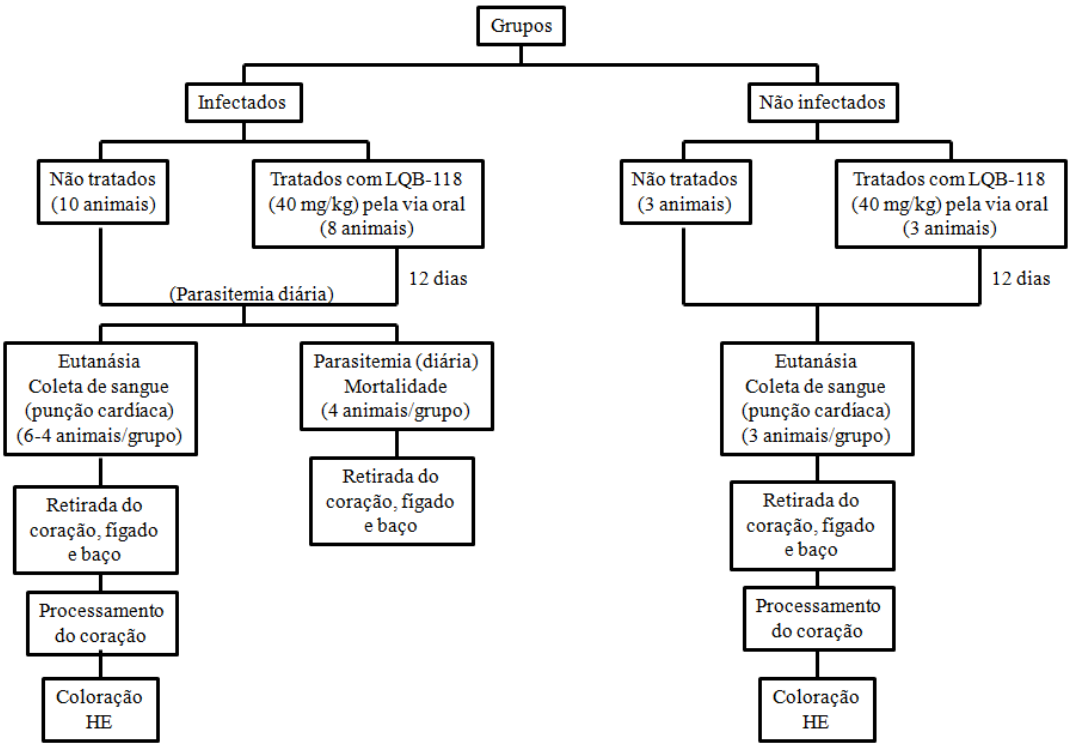
Depois da infecção, os animais foram mantidos em condições apropriadas no biotério. Dos 19 animais infectados, 18 animais apresentaram parasitemia positiva e foram utilizados no experimento no 4º dia pós-infecção.

Os animais foram divididos em 4 grupos: (1) Animais infectados e não tratados (n=10); (2) Animais infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) via oral (n=8); (3) Animais não infectados e não tratados (n=3) e (4) Animais não infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) por via oral (n=3).

Para realizar o tratamento oral, 50mg de LQB-118 foi solubilizada em 100 µL de DMSO (Sigma - Aldrich) e posteriormente solubilizada em 5 mL de ORA-Plus (Perrigo®). Cada animal tratado recebeu 100µL dessa solução (LQB-118 + DMSO + ORA-Plus) uma vez ao dia, correspondendo a 40mg/Kg/dia durante 12 dias consecutivos.

O grupo 1 e 2 foram subdivididos em dois subgrupos, para a avaliação da mortalidade (4 animais/grupo) e para as análise histopatológica e avaliação de parâmetros bioquímicos (6-4 animais/grupo). A parasitemia foi realizada diariamente até o 16º dpi. Um dia após findar o tratamento parte dos animais foram pesados, eutanasiados, o sangue foi colhido (para análise bioquímica) e alguns órgãos (coração, baço e fígado) foram removidos, lavados em solução salina 0,9%, secos em papel filtro, pesados e fixados em formol tamponado 10% (análise histopatológica). Como supracitado, parte dos animais foram mantidos para a análise de percentual de mortalidade. Os animais que vieram a óbito ao longo do experimento também foram pesados e seus órgãos (coração, baço e fígado) foram removidos, lavados em solução salina 0,9%, secos em papel filtro, pesados e fixados em formol tamponado 10%. Após 24 horas, a solução de formol foi trocada. O coração foi processado e realizado a coloração de HE. Os animais não infectados foram eutanasiados e submetidos aos mesmos os procedimentos descritos anteriormente, como indicado na figura 12.

Figura 12 - Desenho experimental do ensaio *in vivo* 2



2.9.3 Avaliação da parasitemia e mortalidade

A parasitemia e o percentual de mortalidade no ensaio *in vivo* 1 (item 2.9.2.1) e no ensaio *in vivo* 2 (item 2.9.2.2) foram avaliadas de maneiras similares.

Para a avaliação da parasitemia foi realizado o seguinte protocolo: (1º) assepsia da cauda de cada animal com gaze embebida em álcool etílico 70%; (2º) corte de aproximadamente 1mm da extremidade distal da cauda utilizando um bisturi cirúrgico (n° 21); (3º) coleta da segunda gota de sangue (5µl) e disposta em uma lâmina para microscópio, coberta com lamínula; (4º) Contenção do sangramento da cauda do animal com permanganato de potássio; (5º) Contagem dos parasitos ao microscópio de luz com objetiva de 40x.

No ensaio 1, a lâmina foi coberta com uma lamínula de 24mm x 32mm e foram examinados 50 campos aleatórios. A positividade foi confirmada no sétimo dia pós infecção e a parasitemia foi realizada no 10º e 15º dpi (dia pós infecção).

No ensaio 2, a lâmina foi coberta com uma lamínula de 24mm x 24mm e foram avaliados 100 campos (em duplicata) aleatórios. A positividade foi confirmada no 4º dpi e parasitemia foi realizada diariamente até o 16° dia pós-infecção ou até a morte do animal (dependendo do grupo).

Para calcular a concentração de parasitos/mL foi utilizado o seguinte cálculo (Castro *et al*, 2000):

1°) $n' = \frac{\text{n° de parasitos}}{\text{n° de campos}}$

2°) $n'' = \frac{n' \times Al}{Ac}$

3°) $n''' = n'' \times 200$

n': n° de parasitos em 1 campo
n'': n° de parasitos em toda a lamínula
n''': concentração do parasito (n° de parasitos em 1mL)
Ac: área do campo observado (πr^2 mm^2)
r: d/2 (d: diâmetro do campo observado)
Al: área da lamínula

Primeiramente se calculou o número de parasitos por campo (1º), com esse resultado, pode-se calcular o número de parasitos existentes em toda a lamínula (2º), depois multiplica-se o valor obtido por 200 (3º), que é o valor de quantas vezes 1000µl é maior que 5µl, obtendo assim a concentração de parasitos em 1mL (1000µl). O resultado foi apresentado em um gráfico com 10^5 tripomastigotas/mL.

A mortalidade foi avaliada através do acompanhamento diário anotando-se o óbito de todos os animais, totalizando 19 dias no ensaio 1 e 23 dias no ensaio 2 .

2.9.4 Avaliação clínica

Foram avaliados parâmetros comportamentais e peso corporal dos animais. Mudanças comportamentais foram avaliadas através de observação do comportamento dos animais, como movimentação (alta ou baixa) e existência de tremores. O peso corporal dos animais foi aferida, no ensaio 1, no sétimo e décimo quarto dia pós-infecção e no ensaio 2, durante dias alternados até o óbito de todos os animais do experimento.

2.9.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A avaliação de parâmetros bioquímicos séricos foi realizada no ensaio *in vivo* 2. Para realizar essa avaliação, o sangue coletado através da punção cardíaca, foi acondicionado em tubos de microcentrífuga (tipo eppendorf) devidamente identificados e incubado na estufa de 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, o sangue foi centrifugado (1301g por 10 minutos). O soro foi coletado e guardado no freezer de geladeira (-18°C) até o dia da análise. Os parâmetros avaliados foram uréia, creatinina, alanina-aminotransferase (ALT) e creatina quinase (CK). As análises foram realizadas utilizando o suporte da Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório, do Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fiocruz.

2.9.6 Processamento, preparo dos cortes e coloração (Hematoxilina-Eosina) das amostra para análise histopatológica

Como descrito anteriormente, nos itens 2.9.2.1 e 2.9.2.2, após a retirada dos órgãos, os mesmos foram lavados em solução salina 0,9%, retirado o excesso de solução com um papel filtro e fixados em formol tamponado 10%, após 24 horas, o formol foi substituído por um novo formol tamponado 10%, devido a saturação do mesmo. Foi realizado o processamento, preparo dos cortes e coloração, apenas no coração.

Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Helmintologia Romero Lascasas Porto (Disciplina de Parasitologia, FCM, UERJ) com o auxilio da técnica Vanessa Saldanha.

Primeiramente, o coração fixado foi cortado na parte superior (na altura da artéria aorta) e inferior (ápice do coração) do órgão e a parte central foi processada. As etapas do processamento estão descritas na Tabela 4:

Tabela 5 - Etapas do processamento do coração.

Etapas	Procedimento	Tempo (minutos)
1º	Água corrente	10
2º	Álcool etílico 80%	5
3º	Álcool etílico 95%	15
4º	Álcool etílico 95%	15
5º	Álcool etílico absoluto	15
6º	Álcool etílico absoluto	15
7º	Álcool etílico absoluto e xilol (1:1)	15
8º	Xilol	15
9º	Xilol	15
10º	Banho de parafina	15
11º	Banho de parafina	15
12º	Inclusão na parafina	

As amostras foram colocadas em cassetes individuais e lavadas para retirada do excesso de fixador (1º etapa), depois as amostras foram desidratadas (2º-6º etapa), diafanizadas (7º-9º etapa) e iniciada a impregnação com parafina líquida (10º e 11º etapas). Na última etapa do procedimento, a amostra foi colocada em uma forma de alumínio e adicionado parafina líquida (60°C).

Para evitar quebras e rachaduras durante a solidificação dos blocos, os moldes ficaram em temperatura ambiente, para que a temperatura do mesmo diminui-se de forma gradual. Atingida a temperatura ambiente, os moldes eram colocados no freezer da geladeira (-18°C) por 20 a 30 minutos e posteriormente, os blocos foram retirados das formas de alumínio e guardados em caixas plásticas, protegidos do calor e umidade excessivos.

A fim de avaliar o infiltrado inflamatório e os ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, foi realizada a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). Para tal, com os blocos foram feitos cortes de 3µm de espessura, utilizando o micrótomo (Leica RM2125 RTS), esses cortes foram esticados em banho-maria, colocados em lâminas de vidro e devidamente identificadas. As etapas da coloração de HE estão descritas na Tabela 5.

Tabela 6 - Etapas da coloração de Hematoxilina-Eosina nos cortes de coração.

Etapas	Procedimento	Tempo (minutos)
1º	Estufa de 60°C	30
2º	Xilol	5
3º	Xilol	5
4º	Álcool etílico absoluto	3
5º	Álcool etílico 90%	1
6º	Álcool etílico 70%	1
7º	Água destilada	-
8º	Hematoxilina	10
9º	Água corrente	15
10º	Água destilada	-
11º	Álcool etílico 80%	10
12º	Eosina	1 e 30 seg
13º	Água destilada	-
14º	Álcool etílico 70%	1
15º	Álcool etílico 90%	1
16º	Álcool etílico absoluto	1
17º	Xilol	2
18º	Xilol	2

Para realizar a coloração, as lâminas foram colocadas na estufa a 60°C (1º etapa), para derreter a parafina, em seguida, com a lâmina ainda quente, inicio-se o processo de desparafinização em xilol e hidratação das amostras com soluções decrescentes de álcool etílico (2º-6º etapa), lavagem e coloração das lâminas. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico e com xilol.

Terminado esses procedimentos, as lâminas foram montadas com uma mistura de bálsamo e xilol e colocado uma lamínula.

2.9.7 Análise histopatológica

A análise histopatológica do coração foi realizada somente nos animais do ensaio 2 (item 3.8.2.2). Para a análise, foram utilizadas lâminas de fragmento cardíaco coradas em HE. As imagens para a análise dos cortes de coração dos camundongos foram capturadas utilizando um câmera de vídeo digital (Nikon DS-Ri7) acoplada a um microscópio (Nikon ECLIPSE 80i) que envia as imagens para um computador (LG) para serem capturadas no

programa NIS-Elements AR 3.2. As imagens capturadas foram visualizadas e gravadas para posterior utilização.

Foram feitas análises qualitativas do infiltrado inflamatório, identificando os tipos celulares que o compõem, e a presença de ninhos de amastigotas.

2.10 **Análise estatística**

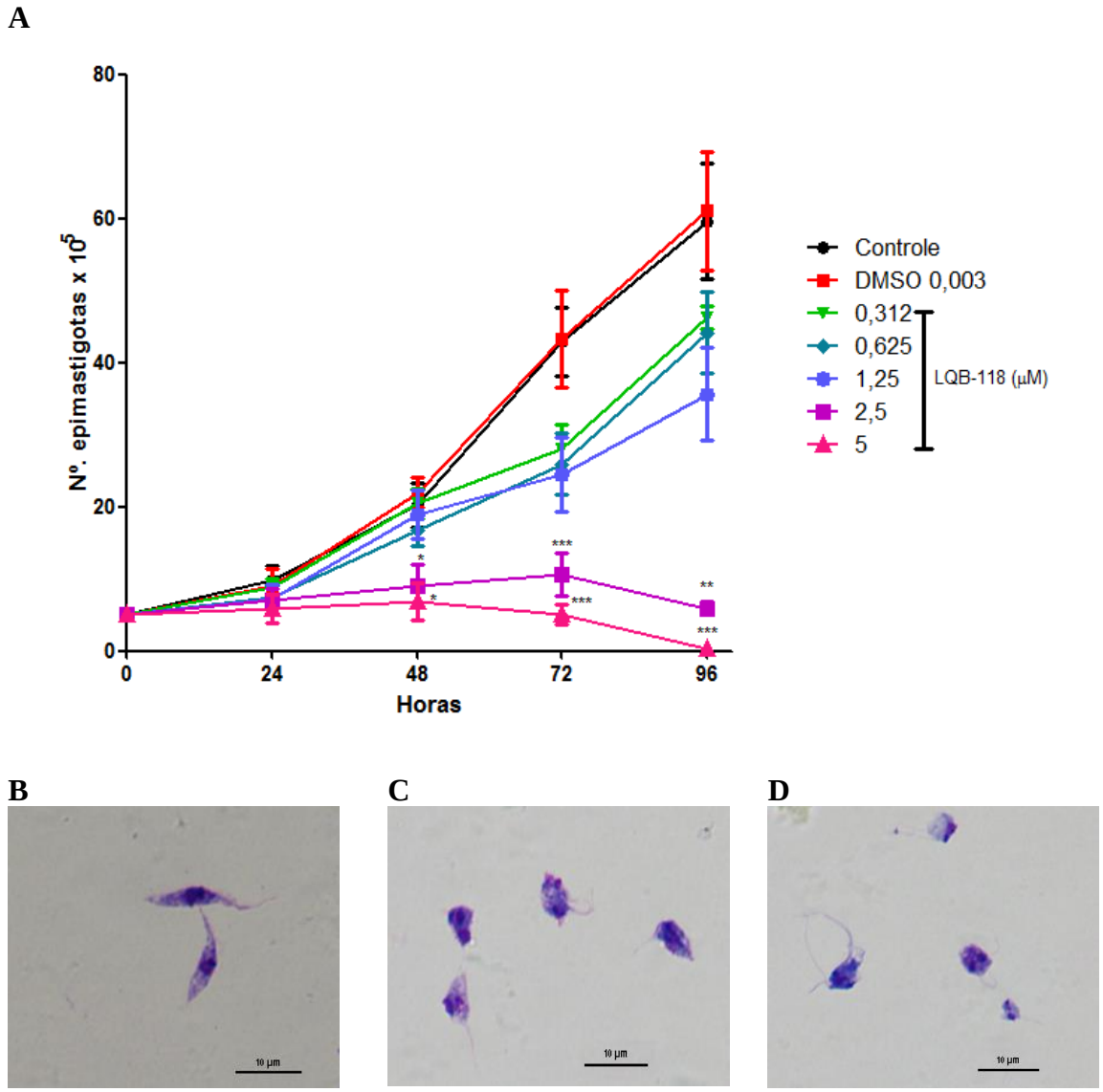
Os dados obtidos foram analisados pelo teste de análise de variância de entrada única (one way ANOVA) com pós-teste Newman-Keuls. A determinação da IC50 foi avaliada através da regressão não linear utilizando o programa "Graph Pad Prism 5". Nos experimentos *in vivo* foi utilizado o teste não paramétrico, Test T (Mann-Whitney test). Valores de *p* iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre as formas epimastigotas *Trypanosoma cruzi* (clone Dm28c)

Para avaliar se a LQB-118 apresenta ação sobre o crescimento das formas epimastigotas (clone Dm28c), as células foram incubadas com a LQB-118 (0-5µM) a 27°C durante 96 horas. Os epimastigotas foram contadas diariamente na câmara de Neubauer. Os resultados mostraram que houve inibição significativa do crescimento das formas epimastigotas a partir de 48 horas, com redução do crescimento de 54,83% e 65,97% nas concentrações de 2,5µM e 5µM, respectivamente. Em 72 horas, houve inibição de 75,13% e 87,91% nas concentrações de 2,5µM e 5µM, respectivamente. Em 96 horas, houve inibição de 91,82% e 99,67% nas concentrações 2,5µM e 5µM, respectivamente (Figura 13A). Em 48h a IC_{50} foi estimada em 2,34µM±0,28µM e em 96 horas foi de 0,88µM±0,08µM. O tratamento com a LQB-118 provocou também modificações morfológicas nas formas epimastigotas (Figura 13 B-D).

Figura 13 - Efeito da LQB-118 no crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*



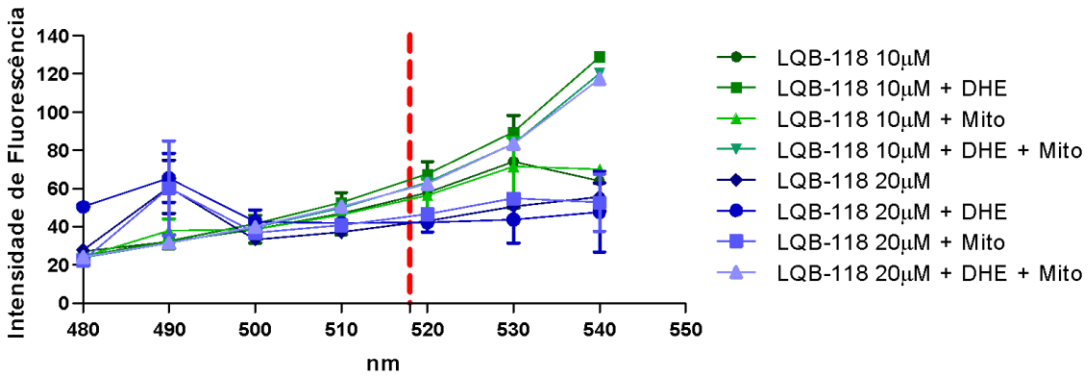
Legenda: Epimastigotas (Dm28c) foram incubadas em triplicata com a LQB-118 (0-5µM) por 96h/27°C. O crescimento do parasito foi acompanhado com contagens diárias em câmara de Neubauer. A) Controles foram parasitos cultivados em meio de cultura contendo ou não DMSO 0,003%. Ao final das 96h de tratamento, os parasitos foram lavados, corados com Panótico e analisados em microscopia de luz (B-D). B) Parasitos incubados somente com o meio. C) Parasitos incubados com 2,5µM de LQB-118. D) Parasitos incubados com 5µM de LQB-118. O gráfico é a média de 5 experimentos independentes. *p<0,01; ***p<0,0001. ANOVA (Newman-Keuls).

3.2 **Efeito da LQB-118 na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c)**

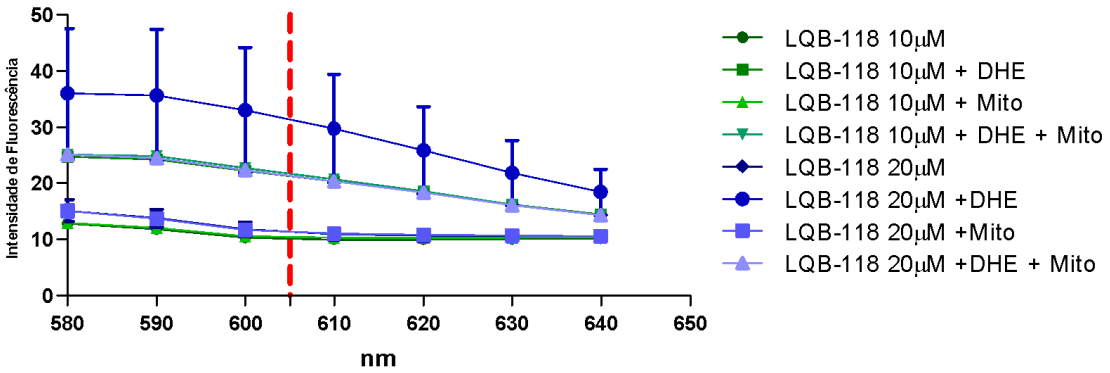
Inicialmente avaliamos se a molécula LQB-118 apresentava autofluorescência no mesmo comprimento da sonda DHE. Foi realizada varredura fluorimétrica nos comprimentos de ondas que variavam de 220nm-800nm. Através dessa análise, pode-se verificar que a LQB-118 não apresenta fluorescência no mesmo comprimento de onda que a sonda utilizada, DHE (picos: 518nm de excitação e 605nm de emissão) (Figura 14).

Figura 14 – Varredura fluorimétrica da LQB-118

A)



B)



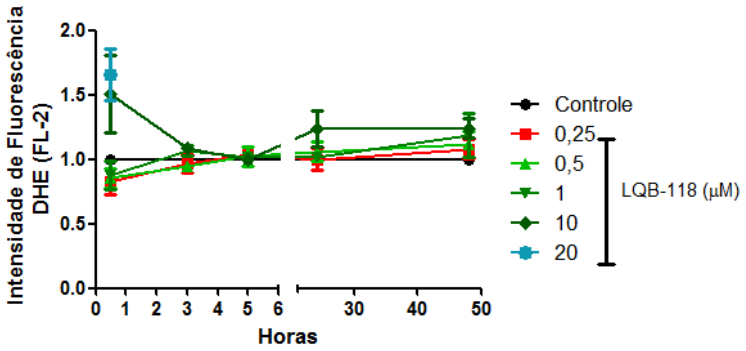
Legenda: A) Curva de excitação (480-540nm) indicando o pico de excitação do DHE (518nm); B)Curva de emissão (580-640nm) indicando o pico de emissão do DHE (605nm). A linha tracejada vertical representa o pico de excitação ou emissão da sonda DHE.

Para avaliar se a inibição do crescimento do parasito estava associada a alteração na produção de espécies reativas de oxigênio pelo parasito, usamos a sonda DHE, que marca

preferencialmente a produção de superóxido mitocondrial. Realizamos uma cinética de tempo de tratamento. Para isso, formas epimastigotas (Dm28c) foram tratadas com a LQB-118 (0-20µM) em diferentes tempos.

A curva indicou que a maior produção de ROS ocorreu nas concentrações de 10µM e 20µM de LQB-118 e no tempo de 30 minutos de tratamento (Figura 15).

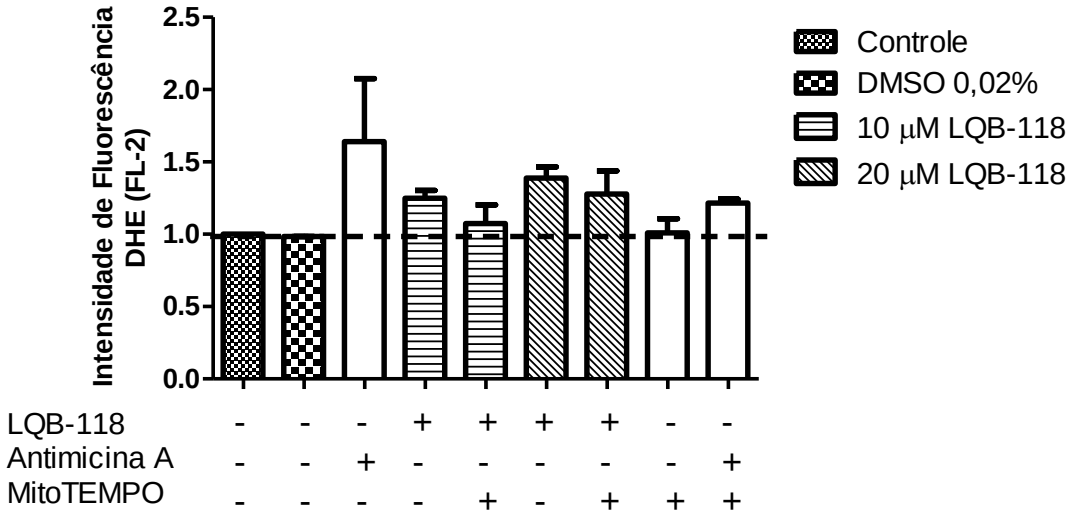
Figura 15 - Cinética de produção de ROS induzido por LQB-118



Legenda: Epimastigotas (Dm28c) ($1x10^7$) foram tratadas com LQB-118 (0-20µM) nos tempos de 30 minutos, 3 horas, 5 horas, 24 horas e 48 horas. Após o tempo de tratamento as células foram lavadas e adicionado a sonda DHE (2µM) por 30 minutos em câmara escura. A intensidade de fluorescência foi avaliada através da citometria de fluxo. Controle utilizado representa as células tratadas com DMSO 0,02%. O gráfico é a média de 3 experimentos independentes de cada tempo.

Após verificar que a maior produção de espécies reativas de oxigênio ocorria no tempo de 30 minutos de tratamento com a LQB-118, foram realizados testes utilizando a antimicina A (pró-oxidante) como controle positivo para produção de ROS e o MitoTEMPO (antioxidante mitocondrial) como um controle negativo para a produção de ROS mitocondrial. Houve um aumento na produção de ROS de 25% e 38,75% nas células tratadas com 10µM e 20µM de LQB-118, respectivamente. Nas células tratadas com LQB-118 e o MitoTEMPO houve uma diminuição na produção de ROS, sugerindo que a LQB-118 afeta a funcionalidade da mitocôndria do parasito (Figura 16).

Figura 16 - Produção de ROS por epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) tratadas com LQB-118



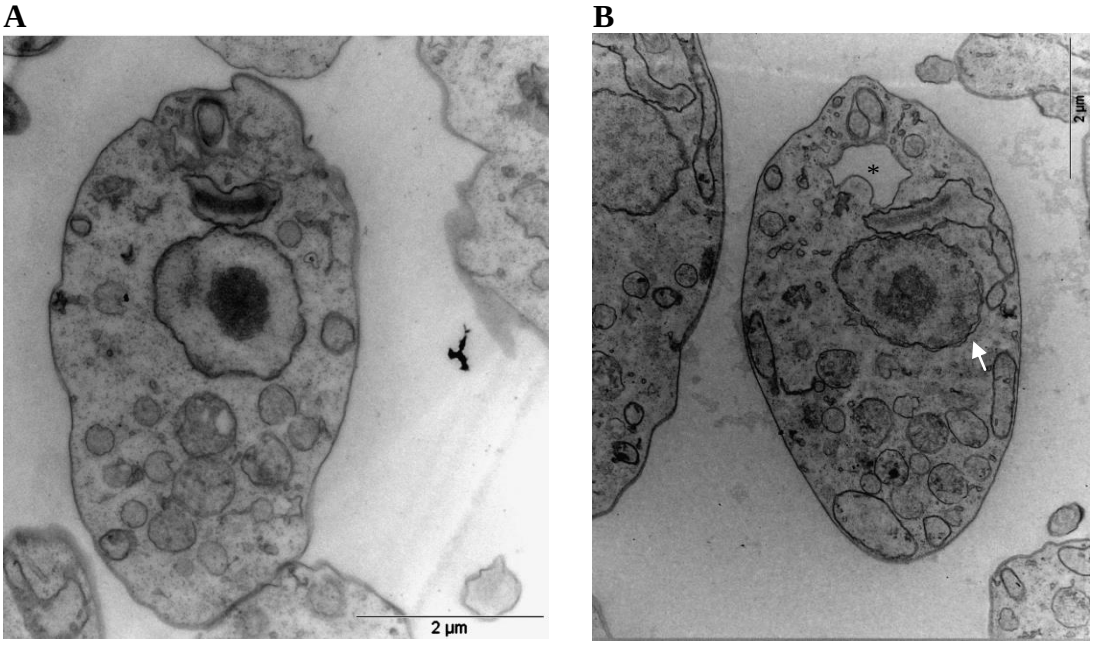
Legenda: Epimastigotas ($1x10^7$) lavadas com PBS e tratadas ou não com MitoTEMPO (10nM) (Mito) por 30 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas e tratadas ou não com LQB-118 (0-20µM) ou Antimicina A (2µg/mL) (AA) e adicionado a sonda DHE (2µM) por 30 minutos em câmara escura. A intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Controle utilizado foram células não tratadas. A linha tracejada horizontalmente indica o valor do controle (células sem tratamento) que é igual a 1. O gráfico representa a média de 2 experimentos.

3.3 **Análise ultraestrutural de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118**

Com o intuito de avaliar se o tratamento com a com a molécula LQB-118 provocaria algum dano estrutural que poderiam levar a morte do parasito, foi realizado a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A LQB-118 na concentração de 2µM em 24 horas de tratamento provocou danos consideráveis em estruturas internas do parasito em comparação com o controle (células tratadas com DMSO na concentração de 0,002%) (Figura 17). Entre os danos observados, temos, uma possíveis regiões de abertura de retículo endoplasmático e vacúolo próximo a bolsa flagelar (Figura 17B).

Figura 17 - Alterações ultraestruturais observadas em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) tratadas com LQB-118 por MET

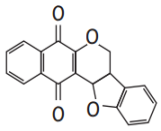


Legenda: Os parasitos foram tratados ou não com 2 µM de LQB-118 por 24 horas. A) Controle, epimastigotas tratadas com DMSO 0,002%. B) Epimastigotas tratadas com LQB-118. Seta: regiões de abertura de retículo endoplasmático; Asterisco: vacúolo próximo a bolsa flagelar.

3.4 **Análise *in silico***

Avaliamos o perfil toxixológico *in silico* da LQB-118 utilizando o programa admetSAR (http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/). A análise no AdmetSAR foi realizada anteriormente por Cunha-Junior (2015) onde a LQB-118 apresentou um perfil favorável, por apresentar uma probabilidade de 100% de absorção intestinal humana, não mostrou-se ser substrato das CYP450 2C9, 2D6 e 3A4 e também, não inibidora das CYP450 2D6 e 3A4. Em relação a análise toxicológica, a LQB-118 mostrou ser um fraco inibidor e uma molécula não inibidor do hERG I e II, respectivamente, também apresentou toxicidade oral aguda categoria II, indicando que doses entre 50-500 mg/Kg seriam tóxicas. Além disso, a análise *in silico* indicou que a LQB-118 são seria carcinogênica (Tabela 6).

Tabela 7 - Análise *in silico* das propriedades toxicológicas da LQB-118

LQB-118	Perfil previsto	Resultado	Probabilidade (%)
	Toxicidade		
	Human ether-a-go-go-related gene (hERG I)	I fraco	92,65
	Inibição (hERG II)	NI	91,47
	Carcinogênicos	NC	96,04
	Toxicidade oral aguda	II	41,03
	Carcinogenicidade (classe III)	NR	59,59

Legenda: I: inibidor; NI: não inibidor; NC: não carcinogênico; NR: não requerido.

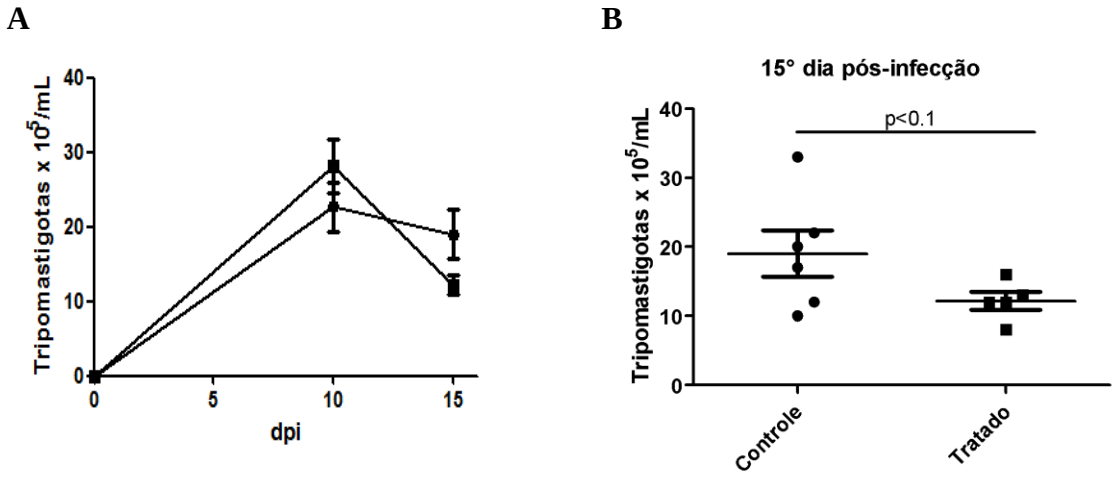
3.5 **Ensaios *in vivo***

3.5.1 Ensaio 1

3.5.1.1 Curva de parasitemia

No ensaio piloto (ensaio 1), foi observado o pico da parasitemia no 10º dia pós-infecção, o grupo tratado apresentou um pico maior em relação ao grupo controle (animais infectados e não tratados), porém no 15º dia pós-infecção, o grupo tratado apresentou uma tendência a redução da parasitemia em 37,8% em relação ao grupo controle (Figura 18A), entretanto esse percentual não foi significativo (Figura 18B).

Figura 18 - Curva de parasitemia de animais tratados com LQB-118

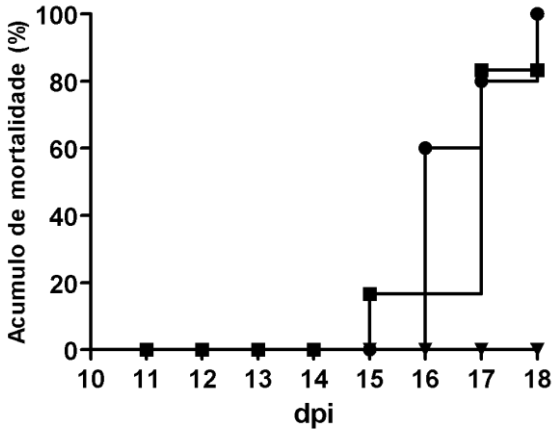


Legenda: Camundongos *Swiss* infectados com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*. (●) Animais infectados e não tratados; (■) Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg/dia) por via oral por 11 dias consecutivos. Os camundongos foram tratados à partir do 7º dia pós-infecção por 11 dias consecutivos e a parasitemia foi realizada nos 10º e 15º dia pós-infecção (dpi). A) Curva de parasitemia com pico no 10° dpi; B) Relação entre o grupo controle e os animais tratados no 15° dpi.

3.5.1.2 Mortalidade

Em relação à curva de mortalidade, podemos observar que o grupo tratado com LQB-118 (20mg/Kg) por via oral por 11 dias consecutivos, apresentou o primeiro óbito no 15º dia pós-infecção, antes do grupo controle (animais infectados e não tratados). Porém, o grupo tratado conseguiu manter a sobrevivência dos animais por mais tempo que o grupo controle. No 16º dpi, 60% dos animais do grupo controle já havia morrido, enquanto no grupo tratado, apenas 20%. No 19º dia pós-infecção, os animais sobreviventes (um animal de cada grupo) foram eutanasiados (Figura 19).

Figura 19 - Acumulo de mortalidade

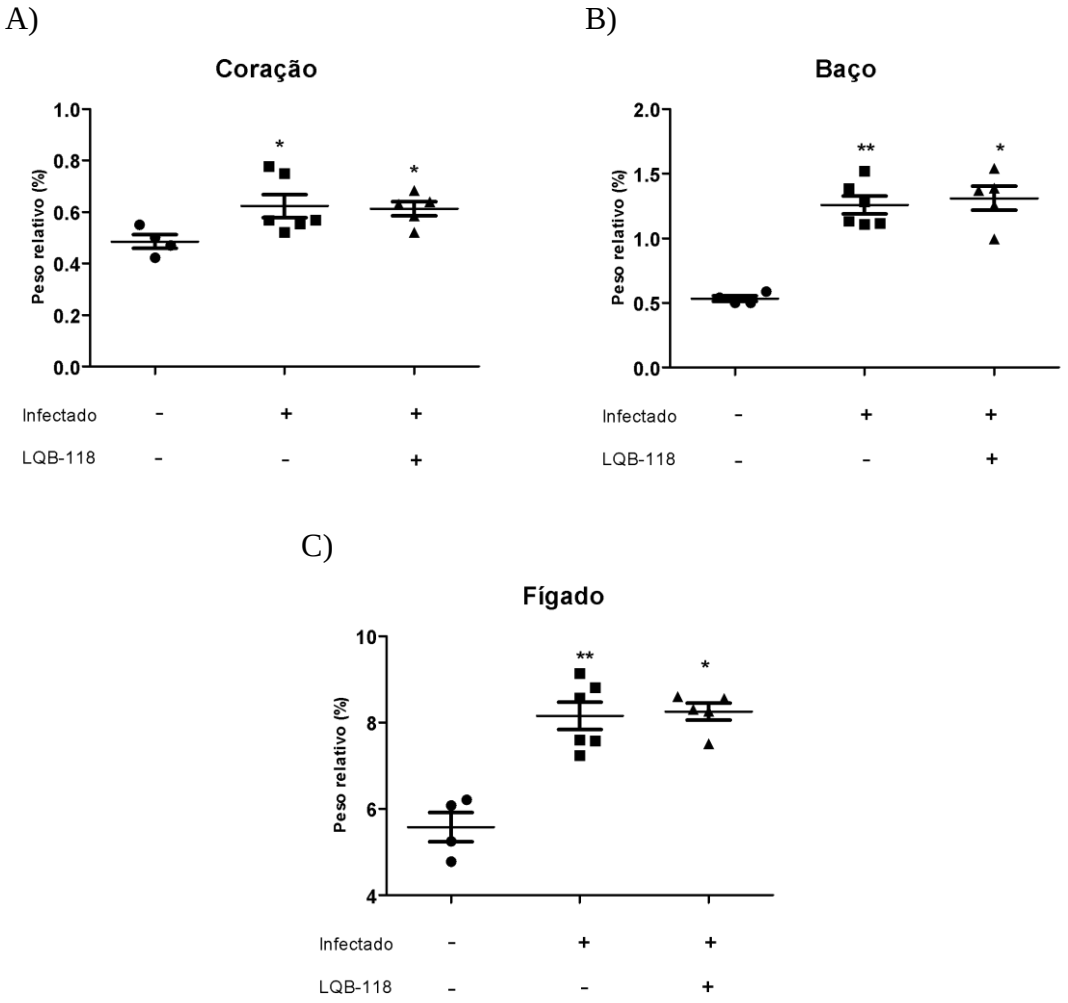


Legenda: Camundongos *swiss* infectados com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*. (●) Animais infectados e não tratados; (■) Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg/dia) via oral por 11 dias consecutivos; (▼) Animais não infectados e não tratados. A taxa de mortalidade dos grupos foi observada até o 18º dia pós-infecção. Os dados representam a percentagem acumulativa dos animais mortos (6 animais/grupo).

3.5.1.3 Pesagem dos órgãos

A fim de analisar alguns sinais clínicos foram avaliados o peso relativo do coração, fígado e baço. Todos os animais infectados tratados ou não, apresentaram aumento do peso dos órgãos (coração, baço e fígado) em relação aos animais não infectados e não tratados (Figura 20). Em relação ao peso do coração, foi observado um aumento de 29,16% no grupo dos animais infectados e não tratados e de 27,08% no grupo dos animais infectados e tratados em comparação com o grupo não infectado e não tratado (Figura 20A). Comparando o peso do baço, o resultado foi ainda maior, observando-se 137,35% de aumento no grupo dos animais infectados e não tratados e 147,16% no grupo dos animais infectados e tratados em comparação com o grupo não infectado e não tratado (Figura 20B). Em relação à pesagem do fígado, houve um aumento de 46,05% no grupo de animais infectado e não tratado e de 47,85% no grupo de animais infectados e tratados em comparação ao grupo de animais não infectados e não tratados (Figura 20C). O aumento no peso dos órgãos não foi diferente entre os grupos infectados tratados e não tratados com a LQB-118.

Figura 20 - Peso relativo do coração, baço e fígado de animais infectados ou não com *T. cruzi*



Legenda: Camundongos *swiss* infectados ou não (6-4 animais/grupo) com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*, mortos ao longo do experimento, foram pesados e seus órgãos retirados e pesados em uma balança de precisão. O peso relativo foi calculado considerando o peso corporal de cada animal. (●) Animais não infectados e não tratados; (■) Animais infectados e não tratados; (▲) Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg/dia) pela via oral, por 11 dias consecutivos. Controle representa animais não infectados e não tratados. **p<0,001 *p<0,01. Teste T (Mann-Whitney test).

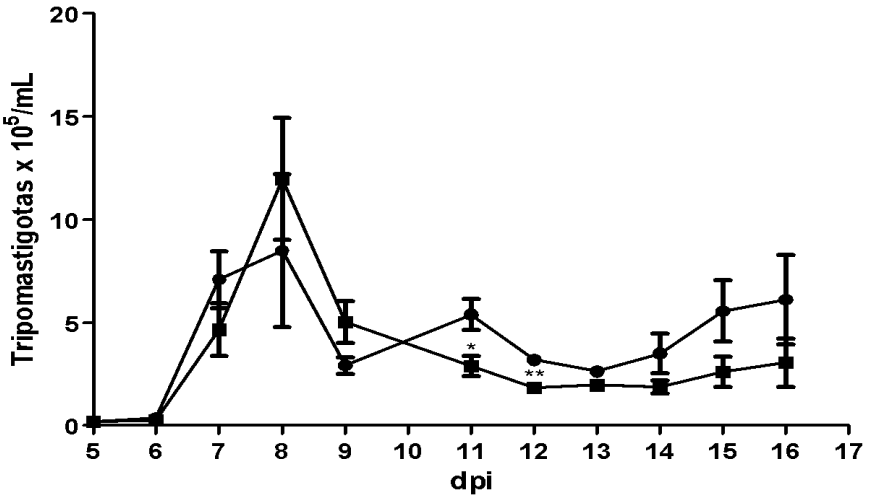
Após essas análises foi decidido por dobrar a dose de tratamento e pela adição de um grupo de animais não infectados e tratados com LQB-118.

3.5.2 Ensaio 2

3.5.2.1 Curva de parasitemia

No ensaio *in vivo* 2, os animais foram tratados diariamente a partir do 4º dia pós-infecção com uma concentração maior de LQB-118 (40mg/Kg) pela via oral, por 12 dias consecutivos. Foi observado o pico da parasitemia no 8º dia pós-infecção (dpi), o grupo tratado apresentou um pico maior em relação ao grupo controle (animais infectados e não tratados). A partir do 11º dpi observou-se redução da parasitemia no grupo tratado. No 11° e 12º dpi a redução da parasitemia foi significativa, sendo 49,47% ($p< 0,02$) e 41,14% ($p< 0,002$), respectivamente. Nos 13º, 14º, 15º e 16º, apesar de não ser significativa, a redução da parasitemia foi 25,2%, 46,86%, 53,3% e 50,17%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 21). No 16º dpi, de parte dos animais (6-4 animais/grupos) foram eutanasiados para análises bioquímicas e histológicas do coração e os demais foram mantidos para avaliação da mortalidade na fase aguda.

Figura 21 - Curva de parasitemia de animais infectados com *T. cruzi*

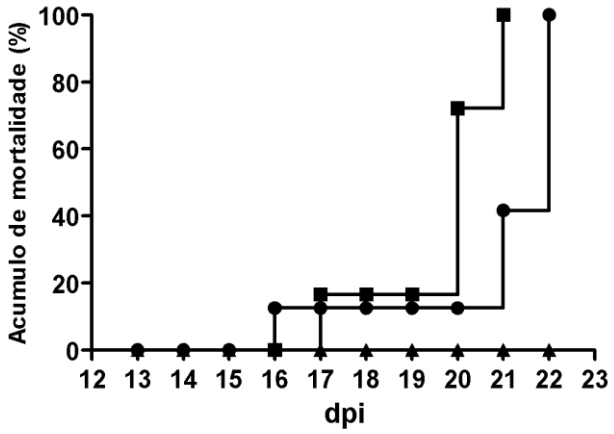


Legenda: Camundongos *Swiss* (10-8 animais/grupo) infectados com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*. (●) Animais infectados e não tratados; (■) Animais infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) pela via oral por 12 dias consecutivos. Os camundongos foram tratados à partir do 4º dia pós-infecção por 12 dias consecutivos e a parasitemia foi avaliada diariamente até o 16º dia pós-infecção. **$p<0,002$ *$p<0,02$. Teste T (Mann-Whitney test).

3.5.2.2 Mortalidade

Em relação a mortalidade, podemos observar que o grupo controle (animais infectados e não tratados) apresentou o primeiro óbito no 16º dia pós-infecção (dpi), antes do grupo tratado com LQB-118. O primeiro óbito do grupo tratado ocorreu no 17º dpi. Porém, no 20° dpi, o grupo tratado com a LQB-118, teve alta mortalidade, chegando a 80%, diferente do grupo controle que no mesmo tempo a mortalidade acumulativa era de 40%. No 21º dpi, 100% dos animais do grupo tratado com a LQB-118 havia morrido, sendo que no grupo controle isso ocorreu no 22º dpi (Figura 22).

Figura 22 - Acumulo de mortalidade



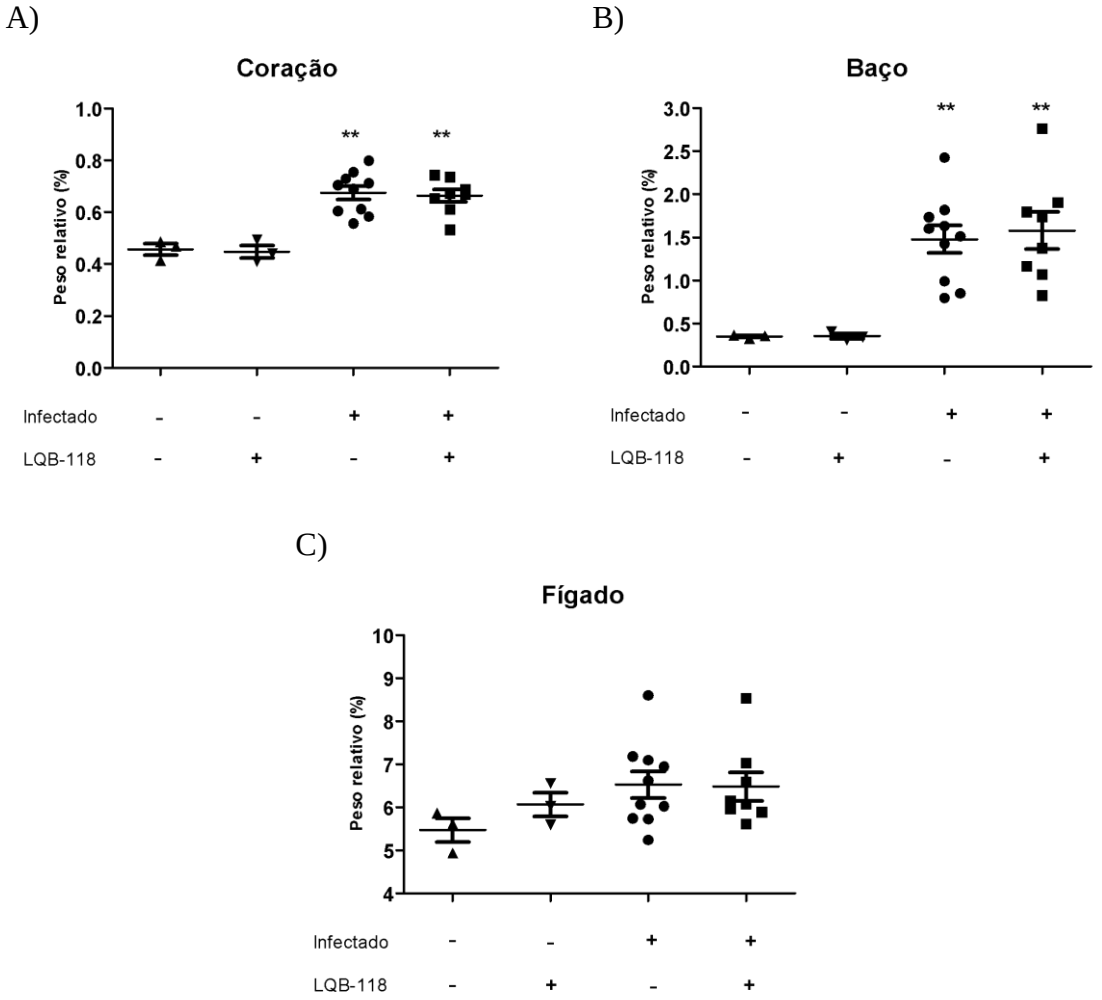
Legenda: Camundongos *Swiss* infectados com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*. (●) Animais infectados e não tratados; (■) Animais infectados e tratados por 12 dias com LQB-118 (40mg/Kg/dia); (▼) Animais não infectados e não tratados. A taxa de mortalidade dos grupos foi observada até o 22º dia pós-infecção. Os dados representam a percentagem acumulativa dos animais mortos (4 animais/grupo).

3.5.2.3 Pesagem dos órgãos

À medida que os animais foram à óbito, avaliamos o peso relativo do coração, fígado e baço dos animais. O peso relativo foi calculado considerando o peso corporal de cada animal. Do mesmo modo como observado no ensaio *in vivo* 1, os animais infectados, tratados ou não com LQB-118, apresentaram aumento do peso dos órgãos (coração, baço e fígado) em relação ao peso dos mesmos dos animais não infectados e não tratados (Figura 23). Em relação ao

peso do coração, foi observado um aumento de 49,7% (p<0,007) no grupo dos animais infectados e não tratados e de 47,1% (p<0,007) no grupo dos animais infectados e tratados em comparação com o grupo não infectado e não tratado (Figura 23A). Comparando o peso do baço, foi observado um aumento de 334,7% (p<0,007) no grupo dos animais infectados e não tratados e de 364,4% (p<0,007) no grupo dos animais infectados e tratados em comparação com o grupo não infectado e não tratado (Figura 23B). Em relação ao peso fígado, houve um aumento de 19,3% no grupo de animais infectado e não tratado e de 18,5% no grupo de animais infectados e tratados em comparação ao grupo de animais não infectados e não tratados, porém esse aumento não foi considerado significativo (Figura 23C). O aumento no peso dos órgãos não foi significativo entre os grupos infectados tratados e não tratados com a LQB-118.

Figura 23 - Peso relativo do coração, baço e fígado dos animais infectados ou não com *T. cruzi*



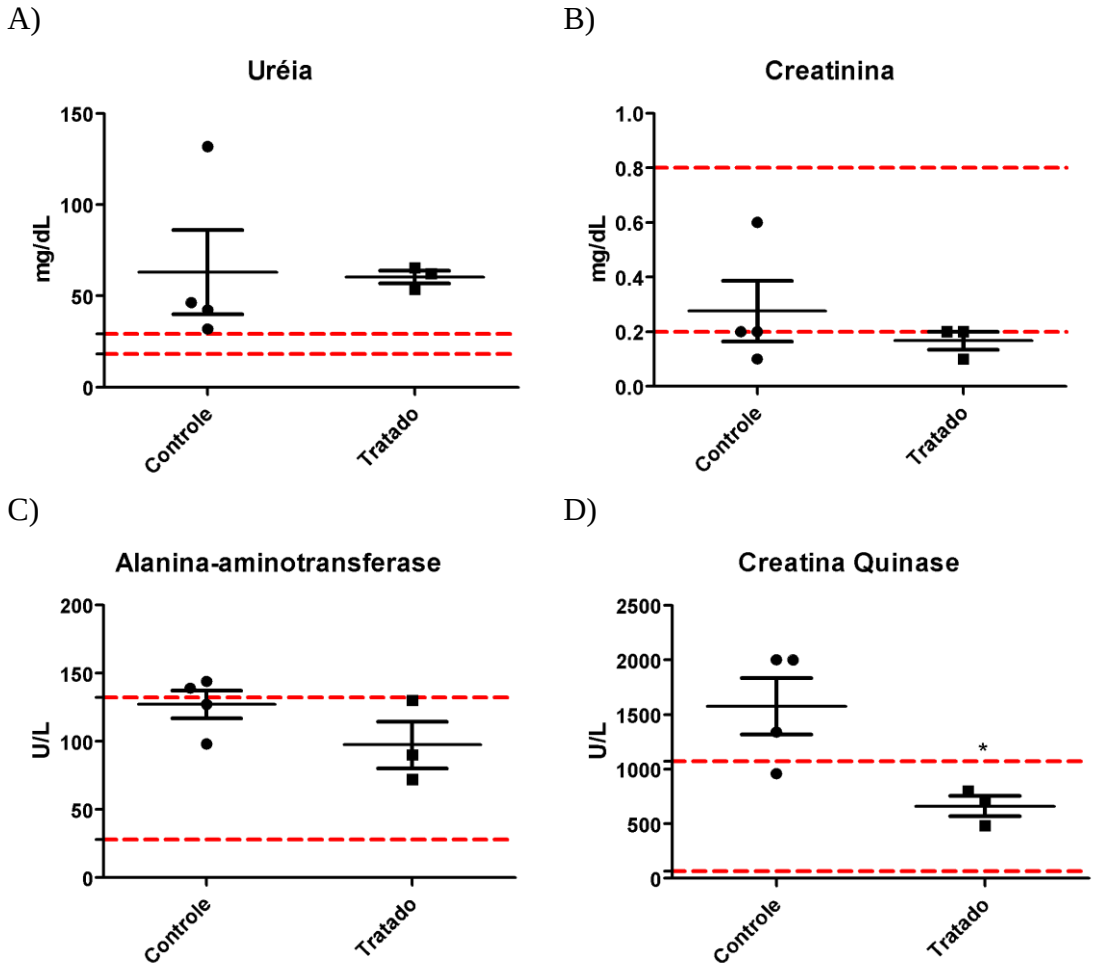
Legenda: Camundongos *Swiss* (3-10 animais/grupo) infectados ou não com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados (3-6 animais/grupo) um dia após o fim do tratamento (16° dpi) ou mortos ao longo do experimento, foram pesados e seus órgãos retirados e pesados em uma balança de precisão. O peso relativo foi calculado considerando o peso corporal de cada animal.

(▲) Animais não infectados e não tratados, (▼) Animais não infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) pela via oral por 12 dias consecutivos, (●) Animais infectados e não tratados; (■) Animais infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) pela via oral por 12 dias consecutivos. Controle animais não infectados e não tratados. **p<0,007. Teste T (Mann-Whitney test).

3.5.2.4 Análises bioquímicas

Foram avaliados como parâmetros bioquímicos testes que poderiam indicar alterações na função renal (uréia e creatinina), na função hepática (alanina-aminotrasferase (ALT) e danos musculares (creatina). Tanto no grupo controle (animais infectados e não tratados) como no grupo tratado (animais infectados e tratados com 40mg/Kg de LQB-118) houve um aumento dos níveis de uréia comparados aos valores de referência (18-29mg/dL) (Figura 24A). Em relação a creatinina, os valores do grupo controle e tratado ficaram dentro ou próximos dos valores de referência (0,2-0,8mg/dL) (Figura 24B). Na avaliação das alterações na função hepática, aferida através dos valores de ALT, os grupos controle e tratados apresentaram níveis dentro dos valores de referência (28-132U/L) (Figura 24C). O grupo controle apresentou níveis da creatina quinase acima dos valores de referência (68-1070U/L) diferentemente do grupo tratado que permaneceu dentro dos limites (p<0,04) (Figura 24D).

Figura 24 - Parâmetros bioquímicos



Legenda: Camundongos *swiss* infectados (6-4 animais/grupo), tratados com LQB-118 (40mg/mL) pela via oral por 12 dias consecutivos ou não (controle) foram eutanasiados no 16° dpi (um dia após o fim do tratamento) e o sangue coletado através de punção cardíaca. O sangue foi incubado em estufa de 37° C por 30 minutos. Após esse tempo, o sangue foi centrifugado (1301g por 10 minutos) e o soro obtido. A) Uréia (valores de referência: 18-29mg/dL). B) Creatinina (valores de referência: 0,2-0,8mg/dL). C) Alanina-aminotransferase (valores de referência: 28-132U/L). D) Creatina quinase (valores de referência: 68-1070U/L). As linhas tracejadas indicam os valores de referências da Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório, do Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fiocruz. Apenas, 4 animais do grupo controle e 3 animais do grupo tratado foi possivel a analise do soro, pois os demais estavam hemolizados. *p<0,04. Teste T (Mann-Whitney test).

3.5.2.5 Análise histopatológica

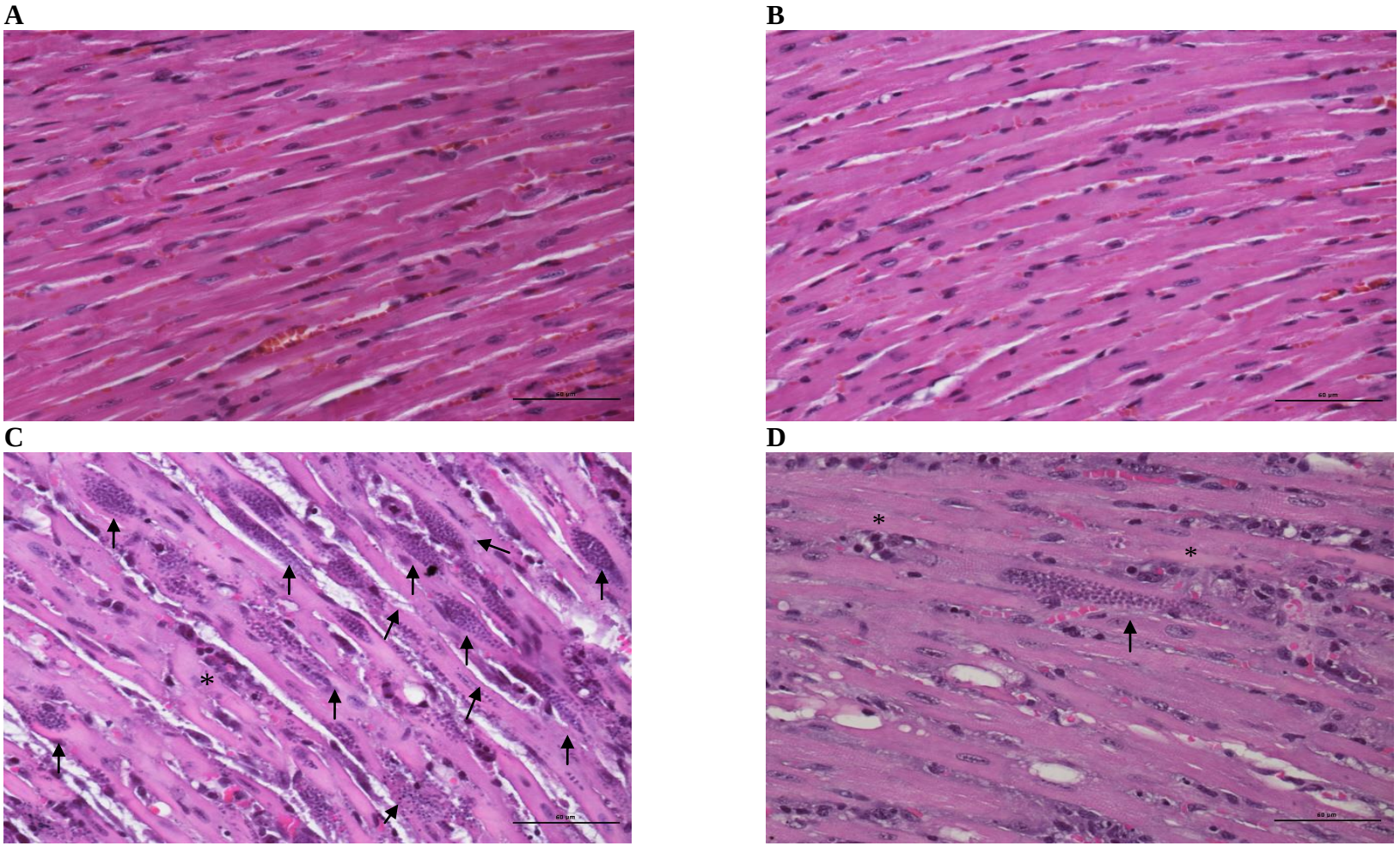
A análise histológica preliminar foi realizado no coração dos animais do ensaio *in vivo* 2. Foram analisados os cortes do tecido cardíaco dos quatro grupos, (1) animais não infectados e não tratados, (2) animais não infectados e tratados com LQB-118 (40mg/mL) pela via oral por 12 dias consecutivos, (3) animais infectados e não tratados, (4) animais

infectados e tratados com LQB-118 (40mg/mL) pela via oral por 12 dias consecutivos, a partir do 4° dia pós infecção.

Nos grupos de animais não infectados, não foi observado qualquer alteração que sugerisse algum dano tecidual tanto no grupo sem tratamento como no grupo tratado com a LQB-118 (40mg/mL) (Figura 25 A e B).

Em relação aos grupos animais infectados, pode-se observar no grupo não infectado um infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleadas, aparente degradação das fibras cardíacas e muitos ninhos de amastigotas espalhados por todo o tecido cardíaco (Figura 25 C), no grupo tratado, houve uma diminuição do infiltrado inflamatório e do número de amastigota (Figura 25D).

Figura 25 - Análise histopatológica do coração de animais infectados ou não com *T. cruzi*



Legenda: Cortes histológicos de tecido cardíaco de camundongos *Swiss* foram corados com hematoxilina e eosina. As amostras foram obtidas de todos os grupos, infectados ou não pelo *T. cruzi* (cepa Y). A) Grupo não infectado e não tratado. B) Grupo não infectado e tratado com LQB-118 (40mg/Kg) pela via oral por 12 dias consecutivos; C) Grupo infectado e não tratado com presença de ninhos de amastigotas (seta) e infiltrado inflamatório (asterisco); D) Grupo infectado e tratado com LQB-118 (40mg/Kg) pela via oral por 12 dias consecutivos, com presença de ninho de amastigota (seta) e infiltrado inflamatório (asterisco). Aumento de 400x.

4 **DISCUSSÃO**

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma zoonose, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Essa doença é endêmica em todos os países da América Central e do Sul, bem como o México (Steverding, 2014).

Se passado mais de 100 anos da descoberta da doença (1909), o tratamento se restringe ao uso de dois medicamentos, Benznidazol e Nifurtimox. Esses medicamentos são utilizados principalmente para o tratamento de casos agudos da doença de Chagas, porém são considerados menos eficientes na fase crônica (Pérez-Molina *et al*, 2015; Steverding, 2014; Carod-Artal e Gascon, 2010). Os medicamentos apresentam alta toxicidade como reações de hipersensibilidade na pele e diversos efeitos gastrointestinais, além de perda de peso, dores de cabeça e mialgia (Pérez-Molina *et al*, 2015; Carod-Artal e Gascon, 2010). Devido ao longo tempo de tratamento, que pode levar até 90 dias, e as diversas reações adversas, a frequencia de interrupção do tratamento é alta para os dois fármacos, podendo chegar a 75% com o nifurtimox e 29% com o benznidazol (Pérez-Molina *et al*, 2015). Sendo assim a pesquisa de novos fármacos é necessária visando uma maior eficácia, sobretudo na fase crônica, além de ampliar as alternativas terapêuticas.

Com o objetivo de colaborar para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, nosso grupo de colaboradores sintetizou a pterocarpanoquinona LQB-118, uma molécula hibrida constituída de uma naftoquinona (lapachol) e um pterocarpano (Maia *et al*, 2011). Estudos anteriores mostraram o efeito antitumoral e antiparasitário da LQB-118. A molécula induz apoptose em vários tipos de linhagens leucêmicas, tais como a linhagem de leucemia mielóide crônica (CML), de leucemia linfoblástica aguda (Sá Bacelar *et al*, 2013; Maia *et al*, 2011), leucemia mielóide aguda (AML) (Souza Reis *et al*, 2013) e em células de câncer de próstata (Martino *et al*, 2014). Os efeitos antiparasitários foram mostrados contra *Leishmania amazonenses* promovendo a redução da produção de ATP e a indução de apoptose em promastigotas e fragmentação do DNA em amastigotas (Ribeiro *et al*, 2013). *In vivo* a administração por via oral promoveu a diminuição da lesão e da carga parasitária (Cunha-Júnior *et al*, 2011).

Em *Leishmania braziliensis* nosso grupo mostrou que a LQB-118 promove aumento da produção de ROS e redução de ATP em promastigotas e *in vivo* e diminui o tamanho da lesão e carga parasitária tanto com tratamento oral ou intralesional em hamster infectado (Costa *et al*, 2014).

No presente estudo foi avaliada a atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o *Trypanosoma cruzi*. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram ação contra as três principais formas evolutivas do *T. cruzi* clone Dm28c. Em formas amastigotas intracelulares, a LQB-118 foi capaz de reduzir significativamente o índice de infecção de modo dose-dependente, sendo a IC_{50} estimada em 4,2µM. Em formas tripomastigotas, a IC50 foi estimada em 38,1µM (Azevedo, 2013) (dados não publicados). Assim a fim de delinear possíveis mecanismos de ação da LQB-118 sobre o *T. cruzi* e, pela primeira vez, observar sua ação *in vivo*, dessa molécula nesse modelo de infecção, o atual trabalho foi desenvolvido.

Para tal, foi utilizado nos experimentos *in vitro* o clone Dm28c, que apresenta comportamento biológico, como crescimento e ciclo celular, de um fiel representante da espécie *T. cruzi* (Contreras *et al*, 1988), além de complementar os dados anteriores de nosso grupo. Já nos experimentos *in vivo* foi utilizada a cepa Y, por ser uma cepa virulenta no modelo experimental utilizado (Araujo-Jorge, 2000), com tropismo por fibras musculares cardíacas, podendo afetar o fígado e o baço, órgãos também acometidos durante a fase aguda da doença de Chagas (Souza e Alencar, 1984). Como modelo experimental, foram utilizados camundongos (ordem Rodentia, família Muridae e espécie *Mus musculus*) (Santos, 2002). A escolha pela linhagem de camundongos albinos *Swiss* não isogênico, originais dos Estados Unidos da América (EUA) a partir de uma colônia de nove animais trazidos para Lausanne, Suíça em 1926 por Clara Lynch (DTAPED), se deve pela sua suscetibilidade a diferentes cepas de *T. cruzi*, não apresentando diferença na resistência quanto ao sexo, além de serem modelos clássicos para o estudo de quimioterapia experimental (Araújo-Jorge, 2000; Castro *et al*, 2000).

Sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) observamos um efeito tempo e dose-dependente. A partir de 48 horas, com inibição de 54,83% e 65,97% nas concentrações 2,5µM e 5µM, respectivamente. No tempo de 96h a inibição foi quase total, atingindo 91,82% e 99,67% nas concentrações 2,5µM e 5µM, respectivamente (Figura 13 A). A IC_{50} foi estimada em 2,34±0,28µM em 48h e 0,88±0,08µM em 96h. O tratamento com a LQB-118 provocou modificações morfológicas nas formas epimastigotas. Observamos encolhimento celular e células arredondadas, característico de células em apoptose (Elmore, 2007) principalmente nas duas maiores concentrações testadas (Figura 13 B-D).

Com o intuito de delinear o mecanismo de ação da LQB-118, avaliamos se a molécula estimularia a produção de espécie reativas de oxigênio (ROS) em epimastigotas. As ROS englobam inúmeras espécies que podem ser altamente reativas. Em condições normais, essas espécies reativas são mantidas nos níveis fisiológicos por diversos sistemas antioxidantes

endógenos e desempenham um papel na mediação da sinalização celular. Em níveis patológicos, a ROS podem resultar em dano oxidativo aos componentes celulares e ativar várias vias de morte celular (Dai *et al*, 2014). A LQB-118 é uma molécula híbrida, resultante da junção de uma naftoquinona (lapachol) e um pterocarpano (Costa, 2009) e a sua porção quinona pode participar do ciclo redox da célula, atuando como um precursor de espécies reativas de oxigênio e levando ao estresse oxidativo (Maia *et al*, 2011). Em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis* tratadas com LQB-118, foi visto um aumento de produção de ROS de forma tempo e dose-dependente (Costa *et al*, 2014; Ribeiro *et al*, 2013). Inicialmente, realizamos um cinética de tratamento, utilizando a sonda DHE como marcador de produção de superóxido mitocondrial. Observamos que a maior produção de ROS ocorria nas concentrações de 10µM e 20µM de LQB-118 e no tempo de 30 minutos de tratamento (Figura 15). Ao definir as melhores concentrações e melhor tempo, foram realizados testes utilizando um pró-oxidante (Antimicina A) e um antioxidante mitocondrial (MitoTEMPO), a fim de verificar se o aumento da produção de ROS era de origem mitocondrial. Houve um aumento na produção de ROS de 25% e 38,75% nas células tratadas com 10µM e 20µM de LQB-118, respectivamente. Nas células tratadas com LQB-118 e o MitoTEMPO, houve uma diminuição na produção de ROS (Figura 16). Apesar de o resultado não ter sido considerado significativo pelo programa estatístico utilizado, eles sugerem que a LQB-118 afeta a funcionalidade da mitocôndria do parasito.

Tripanossomatídeos apresentam apenas uma mitocôndria, com o DNA contido em uma região denominada cinetoplasto, essa região está ligada fisicamente a bolsa flagelar e está posicionado perpendicularmente ao eixo do flagelo (Mota, 2008). Além da mitocôndria, outras organelas são extremamente importantes para a sobrevivência do parasito, como o complexo de Golgi; Nesta organela que nascem as vesículas que migram para bolsa flagelar, onde descarregam o seu conteúdo (Souza, 2009) e está relacionada a glicolisação de proteínas (Souza, 2008). O tratamento de protozoários com diversas drogas, incluindo naftoquinonas, pode levar à diferentes alterações mitocondriais. Além das alterações na própria organela, o cinetoplasto (kDNA) também apresenta desorganização estrutural, tomando uma forma irregular (Menna-Barreto e Castro, 2014). Estudos mostraram danos ultraestruturais em *T. cruzi*, incluindo, desorganização na morfologia dos reservossomos, inchaço mitocondrial, formação de bolhas na membrana plasmática, formação de estruturas membranosa concêntricas no citoplasma, grave interrupção do complexo de Golgi (alteração das cisternas) e condensação anormal da cromatina, causados por naftoquinonas (Menna-Barreto *et al*, 2009; Menna-Barreto *et al*, 2007). Verificamos que o tratamento de epimastigota com 2µM de

LQB-118 por 24 horas, causou diversos danos ultraestruturais no parasito. Entre os danos observados, alterações sugestivas de abertura de retículo endoplasmático, aumento da região do cinetoplasto e vacúolo próximo a bolsa flagelar (Figura 17B). Foram observados também, desarranjo do complexo de Golgi (dados não mostrados). Nosso grupo de colaboradores mostraram anteriormente que o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com a LQB-118 também provocou alterações ultraestruturais como, desarranjo do complexo de Golgi, inchaço da mitocôndria, condensação da cromatina nas margens do núcleo e formação de vesículas (Ribeiro *et al*, 2013).

Após os resultados positivos mostrados *in vitro* neste trabalho e visando a busca de novos fármacos, testamos pela primeira vez, a molécula LQB-118 no tratamento de camundongo infectados com *T. cruzi*. Antes dos testes *in vivo*, avaliamos o perfil das propriedades farmacocinéticas *in silico* através do programa admetSAR. Uma análise acerca dos descritores moleculares de Lipinski (Ro5) foi realizada recentemente para a que demonstrou não violar nenhuma das regras (Cunha-Júnior, 2015). Esse dado indica características favoráveis para uma administração oral da molécula. A análise preditiva de parâmetros farmacocinéticos feita *in silico* usando o programa ADMET indicou a via oral como uma das possíveis cias de administração da LQB-118, pois apresentou boa capacidade de ser absorvida pelo trato gastrointestinal humano (100% de absorção) intestinal humana.

A família de isoenzimas citocromo P450 (CYP450) são responsáveis pela biotransformação de diversas drogas e o metabolismo de fármacos através desse sistema é importante aspecto a ser analisado pois sua indução ou inibição pode levar a interações medicamentosas resultando em toxicidade de drogas, redução do efeito farmacológico e reações adversas a medicamentos (Ogu e Maxa, 2000). Dentre as isoenzimas que compõem a família, as 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A3/4 são reconhecidas como as mais importantes para o metabolismo de drogas (Audi e Pussi, 2000). Nossa análise indicou que a LQB-118 tem grandes possibilidade de não ser substrato das CYP450 2C9 e de não ser tanto substrato como inibidor das CYP450 2D6 e 3A4. Indicando que a LQB-118 não competiria com fármacos metabolizados por essas isoenzimas, como alguns antiarrítmicos, antibióticos, anticonvulsivantes que são metabolizados pela isoenzima CYP450 3A4 (Audi e Pussi, 2000).

Na análise toxicologica, a LQB-118 não se mostrou uma molécula inibidora do gene hERG I e II. O gene hERG (*human ether-a-go-go-related gene*) está relacionado com o rítmo cardíaco, e sua inibição poderia levar a um prolongamento do intervalo QT (duração da despolarição e repolarização ventricular), o que levaria ao aparecimento de arritmia cardíaca (Noord *et al*, 2010; Walker *et al*, 1999). Outro ponto importante é o fato da LQB-118 ter

apresentado a toxicidade oral aguda de categoria II, indicando seria potencialmente tóxica nas doses entre 50 a 500mg/Kg, além disso, pela análise não foi considerada uma molécula carcinogênica(Tabela 5). Após essa análise preditiva, a LQB-118 se mostrou uma molécula segura pra a realização dos ensaios *in vivo*.

Estudos anteriores demonstraram a eficácia do tratamento oral da leishmaniose experimental. Cunha-Júnior e colaboradores (2011) demonstraram que em camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* e tratados oralmente com LQB-118, houve diminuição da lesão e da carga parasitária. Costa e colaboradores (2014) trataram hamsters infectados com *L. braziliensis* com a LQB-118 por duas vias, oral e intralesional, demonstrando que o tratamento diminuiu significativamente o tamanho da lesão bem como a carga parasitária.

O primeiro ensaio desse estudo tivemos como objetivo avaliar a mortalidade na fase aguda. Nesse primeiro ensaio os camundongos *Swiss*, foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y e tratados com LQB-118 (20mg/Kg/dia) pela via oral por 11 dias consecutivos a partir do 7º dpi (dia pós-infecção). O pico da parasitemia ocorreu no 10º dpi, onde o grupo tratado apresentou o pico de parasitemia maior que o grupo não tratado. Já no 15º dpi houve uma queda na parasitemia, sendo que no grupo tratado com a LQB-118, esta diminuição foi de 37,8% em comparação ao grupo controle, apesar desse resultado não ser considerado significativo (Figura 18). No 16º dpi, 60% dos animais do grupo controle já havia ido a óbito, enquanto no grupo tratado apenas 20% dos animais tinham morrido (Figura 19). A partir da terceira semana de infecção, os animais começaram a ficar extremamente debilitados, porém o peso corporal não diminuiu ao longo do experimento (dados não mostrados).

Entre as principais alterações da fase aguda da doença de Chagas, encontram-se a hepatoesplenomegalia e a miocardite (Coura e Borges-Pereira, 2010). Por isso, avaliamos os pesos relativos desses três órgãos (coração, fígado e baço) durante a fase aguda da doença de Chagas, em animais infectados ou não com o *T. cruzi* (cepa Y).

No primeiro ensaio o coração aumentou 29,16% e 27,08% nos grupos infectados/ não tratados e infectados/tratados, respectivamente, em comparação aos animais não infectados. O baço e o fígado também aumentaram, o baço foi de 137,35% e 147,16% nos grupos infectados/ não tratados e infectados/tratados, respectivamente, em comparação aos animais não infectados, já o fígado aumentou em 46,05% e 47,85% nos grupos infectados/ não tratados e infectados/tratados, respectivamente, em comparação aos animais não infectados (Figura 20). Comparando os grupos infectados tratados ou não, observamos que o coração do grupo não tratado é 7,6% maior que o do grupo tratado, porém o baço e o fígado do grupo

tratado foi maior que do grupo não tratado, 7,1% e 3,9%, respectivamente, porém essa diferença não foi considerada significativa.

Não foi possível realizar a histopatologia do coração, pois os órgãos foram retirados algumas horas após a morte do animal e qualquer alteração da histologia poderia ser consequência da degradação natural.

No segundo ensaio *in vivo*, os camundongos *Swiss* machos foram infectados com a mesmo concentração de tripomastigotas que o ensaio anterior, porém decidimos aumentar a concentração da LQB-118, de 20mg/Kg/dia para 40mg/Kg/dia. Nesse experimento, o tratamento iniciou-se quando a parasitemia foi positiva (4º dpi) e durou 12 dias consecutivos e a parasitemia foi avaliada diariamente. O pico da parasitemia ocorreu no 8º dpi, 2 dias antes se comparada ao primeiro experimento. O pico da parasitemia do grupo tratado foi maior que no grupo não tratado, semelhante ao primeiro experimento. No 11º e 12º dpi a redução da parasitemia do grupo tratado foi significativa, sendo 49,47% ($p< 0,02$) e 41,14% ($p< 0,002$), respectivamente, em relação ao grupo não tratado. Nos 13º, 14º, 15º e 16º, apesar de não ser significativa, a redução da parasitemia foi 25,2%, 46,86%, 53,3% e 50,17%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 21). Comparando o 15° dpi dos dois experimentos realizados, verificamos que a redução da parasitemia foi maior no segundo experimento, indicando que o aumento da dose da LQB-118 gerou efeitos positivos no tratamento. No 16º dpi, que equivale ao 1° dia após o fim do tratamento, parte dos animais foram eutanasiados para análises bioquímicas e histológicas do coração e o restante foi mantido.

Assim como no experimento anterior, a partir da terceira semana, os animais ficaram extremamente debilitados, porém, não houve perda significativa de peso corporal entre os animais infectados, tratados ou não. O primeiro óbito do grupo tratado ocorreu no 17º dpi. Porém, no 20º dpi, o grupo tratado com a LQB-118, apresentou alta mortalidade, chegando a 80%, diferente do grupo controle que no mesmo tempomostrou 40% de mortalidade acumulativa. No 21º dpi, 100% dos animais do grupo tratado com a LQB-118 haviam morrido e no grupo controle isso ocorreu no 22º dpi (Figura 22). As anáçises mostraram aumento do peso dos órgãos, comparados com animais não infectados e não tratados. No coração foi observado um aumento de 49,7% ($p<0,007$) e 47,1% ($p<0,007$) no grupo dos animais infectados e não tratados e de no grupo dos animais infectados e tratados, respectivamente, em comparação com o grupo não infectado e não tratado. O miocárdio é o tecido mais afetado durante a infecção por *T. cruzi* (Barreto-de-Albuquerque *et al*, 2015), na qual os pacientes apresentam hipertrofia miocárdica (Higuchi *et al*, 2003), com infiltrado inflamatório ao longo do curso da fase aguda, predominantemente mononuclear (Barreto-de-

Albuquerque *et al*, 2015; Novaes *et al*, 2011), além de miocardite grave e fibrose (Higuchi *et al*, 2003). O baço é um órgão importante para o estabelecimento da infecção *T. cruzi*, visto que é uma fonte de células mononucleares e um reservatório de ferro que é importante para a proliferação do parasito (Maioli *et al*, 2011), essa infecção pode causar necrose de macrófagos e outras células presentes nos centros germinativos do baço (Andrade *et al*, 2008; Cordeiro *et al*, 1997) e hiperplasia do órgão (Maioli *et al*, 2011; Minoprio *et al*, 1986). No baço houve um aumento de 334,7% ($p<0,007$) e 364,4% ($p<0,007$) no grupo dos animais infectados e não tratados e de no grupo dos animais infectados e tratados em comparação com o grupo não infectado e não tratado. Estudos indicam que no fígado, a infecção por *T. cruzi* causa hipertrofia dos hepatócitos, redução da densidade de volume dos capilares e do espaço intersticial, com isso aumentando a massa do fígado (Novais *et al*, 2015), além disso, ocorre um aumento do infiltrado hepático no decorrer da infecção, apoptose dos hepatócitos e um progressivo depósito de colágeno nas paredes dos vasos sanguíneos (Barreto-de-Albuquerque *et al*, 2015). No fígado, houve um aumento de 19,3% no grupo de animais infectado e não tratado e de 18,5% no grupo de animais infectados e tratados em comparação ao grupo de animais não infectados e não tratados, porém esse aumento não foi considerado significativo (Figura 23). Ao compararmos os grupos infectados tratados ou não, observamos que o coração e o fígado do grupo não tratado foi maior do que no grupo tratado, 5,5% e 4,3%, respectivamente. O baço, apresentou um aumento de peso no grupo tratado em comparação ao grupo não tratado de 8,8%. Comparando os dois ensaios realizados, podemos observar que no primeiro ensaio, o grupo tratado apresentou um aumento de baço e fígado em comparação ao grupo não tratado, já no segundo ensaio, o único órgão que se apresentou aumentado em comparação ao grupo não tratado foi o baço, indicando que o aumento da dose de LQB-118 pode ter contribuído positivamente para essa diferença.

As análises bioquímicas só puderam ser feitas no segundo ensaio. Avaliamos parâmetros bioquímicos que poderiam indicar alterações na função renal (uréia e creatinina), na função hepática (alanina-aminotransferase (ALT)) e danos musculares (creatina quinase). Observamos que tanto o grupo controle (animais infectados e não tratados) como o grupo tratado houve aumento dos níveis de uréia comparados aos valores de referência (18-29mg/dL), já o outro marcador da função renal, a creatinina, o grupo tratado apresentou níveis baixos dos níveis de referencia e abaixo do grupo controle, apesar dessa diferença não ser significativa, nossos resultados podem indicar não haver dano renal (Figura 24 B).

Analisando as possíveis alterações na função hepática através dos valores de ALT, observamos que tanto do grupo controle como o grupo tratado apresentaram valores dentro

dos níveis de normalidade, porém, o grupo tratado apresentou os níveis de ALT um pouco abaixo do grupo controle. O último parâmetro analisado foi o nível de creatina quinase (CK). A monitoração da CK é amplamente utilizada no diagnostico de miopatias, cardiomiopatias e encefalopatias, além de ser, um marcador confiável da necrose do miocárdio (Brancaccio *et al*, 2007). O grupo controle apresentou níveis da creatina quinase acima dos valores de referência (68-1070U/L), indicando um possível dano cardíaco, diferentemente do grupo tratado que permaneceu dentro dos limites ($p<0,04$), mostrando que o tratamento com a LQB-118, promoveu um efeito cardioprotetor (Figura 24 C e D).

Avaliamos também cortes do tecido cardíaco dos quadros grupos, animais não infectados tratados ou não e animais infectados tratados ou não. Nesse primeiro momento foi realizada a análise qualitativa. Como dito anteriormente, o miocárdio é um dos tecidos mais afetados durante a infecção por *T. cruzi* em pacientes, na fase aguda da infecção ocorre um processo inflamatório, com fenômenos vasculares, exsudativos e degenerativo necrótico (Lopes *et al*, 1997). Experimentalmente, em diversos modelos, o quadro se assemelha, com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear com macrófagos, linfócitos e seus derivados afetando tanto o pericárdio como o miocárdio, miocardite com necrose miocitolítica e degeneração das miofibras, fibrose intersticial e fibras cardíacas contendo ninhos de amastigotas (Barreto-de-Albuquerque *et al*, 2015; Lopes *et al*, 1997; Chapadeiro *et al*, 1988; Figueiredo *et al*, 1985).

No nosso estudo observamos que animais não infectados e tratados, a LQB-118 não provocou alterações aparentes no tecido cardíaco (Figura 25 A e B). Já em relação aos grupos de animais infectados não tratados, observamos um grande infiltrado inflamatório com predomínio de células mononuclear, aparente degeneração das fibras cardíacas e presença de muitos de ninhos de amastigotas espalhados por toda a extensão tecidual (Figura 25 C). No grupo de animais infectados e tratados, podemos observar uma aparente diminuição do infiltrado inflamatório, da degeneração das fibras cardíacas e da quantidade de ninhos de amastigotas (Figura 25 D), contudo, novos ensaios são necessários a fim de realizar também a nanálise quantitativa do infiltrado inflamatório e do número de ninhos de amastigotas. Esses dados somam-se a análise dos níveis de creatina quinase que indicou um dano muscular maior no grupo infectado e não tratado em comparação com o grupo dos animais infectados e tratados.

De modo geral, nossos dados *in vitro* e *in vivo* indicam que a pterocarpanoquinona LQB-118 apresenta atividade tripanocida importante. Estudos mais aprofundados sobre o modo de ação de molécula e eficácia são importantes para que a LQB-118 seja candidata para

ensaios pré-clinicos e o desenvolvimento de um novo quimioterápico para o tratamento da doença de Chagas.

CONCLUSÃO

A ação da LQB-118 sobre formas epimastigotas foi dependente da dose e do tempo de tratamento. A IC_{50} em 48 horas foi estimada 2,34 µM e em 96 horas foi estimada em 0,88 µM.

Epimastigotas tratadas com LQB-118 tiveram alterações morfológicas sugestivas de apoptose, principalmente nas concentrações de 2,5 e 5 µM da molécula.

Houve um aumento de 25% e 38,75% na produção de ROS em epimastigotas nos primeiros 30 minutos de tratamento com 10 e 20 µM de LQB-118, respectivamente.

A LQB-118 induziu após 24h danos ultraestruturais nas epimastigotas, como alterações sugestivas de abertura de retículo endoplasmático, aumento da região do cinetoplasto e vacúolo próximo a bolsa flagelar, além de desarranjo do complexo de Golgi.

A análise preditiva de parâmetros farmacocinéticos feita *in silico* usando o programa ADMET indicou um perfil favorável para a LQB-118, com alta capacidade de absorção gastrointestinal, toxicidade oral aguda de categoria II (dose tóxica: 50 a 500mg/Kg) e não carcinogênica.

Nos estudos *in vivo*, a LQB-118 foi capaz de diminuir a parasitemia dos animais infectados.

Analises bioquímicas do soro dos animais infectados, indicaram que animais tratados com LQB-118 apresentaram níveis de uréia acima dos valores de referência, porém níveis de creatinina abaixo dos níveis de referência. A uréia e a creatinina são parâmetros que podem indicar alterações na função renal. Contudo os níveis de ALT do grupo tratado apresentou valores dentro dos níveis de normalidade. Já a análise da creatina quinase, mostrou que o grupo tratado apresentou valores dentro do limite dos valores de referência, sugerindo que a LQB-118 não induziu necrose do miocárdio.

Analises histológicas do coração, indicaram a diminuição do infiltrado inflamatório e ninhos de amastigotas em animais tratados com a LQB-118.

REFERÊNCIAS

Andrade, SG, Magalhães, LA. Pessina, DH. Importance of TNF-a in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(1): 21-26.

Araújo, A, Jansen, AM, Reinhard, K, Ferreira, LF. Paleoparasitology of Chagas disease – A Reciew. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (supl. I): 9-16.

Araujo, EL, Alencar, JRB, Neto, PJR. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002; 12 (supl. I): 57-59.

Araújo-Jorge, TC.Modelo animasi para o estudo *in vivo* da doença de Chagas: Camundongo. In: Araujo-Jorge, TC, Castro, SL. Doebça de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz. 2000; 1: 134-140.

Ávila, AR, Dallagiovanna, B, Yamada-Ogatta,SF, Monteiro-Góes,V, Fragoso, SP, Krieger, MA, Goldenberg, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet. Mol. Res. 2003; 2 (1): 159-168.

Audi, EA, Pussi, FD. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas Acta Scientiarum. 2000; 22(2): 599-604.

Azevedo, BF. Atividade *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi*. Dissertação, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, 2013.

Bakker, BM, Westerhoff, HV, Opperdoes, FR, Micheles, PAM. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. Molecular and Biochemical Parasitology. 2000; 106: 1-10.

Barreto-de-Albuquerque, J, Silva-dos-Santos, D, Pérez, AR, Berbert, LR, Santana-van-Vliet, E, Farias-de-Oliveira, DA, Moreira, OC, Roggero, E, Carvalho-Pinto, CE, Jurberg, J, Cotta-de-Almeida, V, Bottasso, O, Savino, W, Meis, J. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015; 9(6): 1-21.

Barrett, MP, Croft, SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. British Medical Bulletin. 2012; 104: 175-196.

Bellini, MF, Silistino-Souza, R, Varella-Garcia, M, Azeredo-Oliveira, MTV, Silva, AE. Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. Journal of Tropical Medicine, 2012: 1-11.

Bermudez, J, Davies, C, Simonazzi, A, Real, JP, Palma, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Tropica. 2016; 156: 1-16.

Brancaccio, P, Maffulli, N, Limongelli, FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. British Medical Bulletin. 2007; 81-82: 209-230.

Bringaud, F, RIVIÈRE, L, Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. Molecular & Biochemical Parasitology. 2006; 149: 1-9.

Buarque, CD, Salustiano, EJ, Fraga, KC, Alves, BRM, Costa, PRR. 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. European journal of Medicinal Chemistry. 2014; 78: 190-197.

Carod-Artal, FJ, Gascon, J. Chagas disease and stroke. Lancet Neurol. 2010; 9: 533–542.

Castro, SL, Araújo-Jorge, TC, Rivera, MT, Junqueira, ACV. Avaliação dos parâmetros parasitológicos e de mortalidade. "In": Araujo-Jorge, TC, Castro, SL. Doebça de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz. 2000; 1: 134-140.

Chapadeiro, E, Beraldo, PSS, Jesus, PC, Oliveira Jr, WP, Junqueira Jr, LF. Lesões cardíacas em ratos *Wistar* inoculados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1988; 21(3): 95-103.

Contreras, VT, Araujo-Jorge, TC, Bonaldo, MC, Thomaz, N, Barbosa, HS, Meirelhes, MNSL, Goldenberg, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1988; 83 (1): 123-133.

Cordeiro, ZMS, Dahia, ACG, Andrade, ZA. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1997; 30(1): 3-9.

Costa L, Pinheiro RO, Dutra PM, Santos RF, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, Silva AJ, Costa PR, Da-Silva SA. Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in Leishmania (Viannia) braziliensis and controls lesions in infected hamsters. Plos One. 2014; 9 (10): 1-8.

Costa, PRR. Produtos Naturais como Ponto de Partida para a Descoberta de Novas Substâncias Bioativas: Candidatos a Fármacos com Ação Antiofídica, Anticâncer e Antiparasitária. Rev. Virtual Quim. 2009; 1 (1): 58-66.

Coura, JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Editora Guanabara Koogan. 2013; 1(2).

Coura, JR, Porges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica. 2010; 115: 5-13.

Coutinho, CBD. Caracterização das espécies do gênero Rhodnius Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método do Código de Barras de DNA. [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituro Oswaldo Cruz; 2013.

Cunha-Júnior, EF. Estudo pré-clinico da LQB-118 para o tratamento da leishmaniose. [tese]. Rio de Janeiro: Instituro Oswaldo Cruz; 2015.

Cunha-Júnior, EF, Pacienza-Lima, W, Ribeiro, GA, Netto, CD, Canto-Carvalho, MM, Silva, AJM, Costa, PRR, Rossi-Bergmann, B, Torres-Santos, EC. Effectiveness of the local or oral

delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(7): 1555-1559.

Cunha-Neto, E, Chevillard, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. Mediators of Inflammation. 2014: 1-11.

Dai, D, Chiao, YA, Marcinek, DJ, Szeto, HH, Rabinovitch, PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. Longevity & Healthspan.2014; 3(6): 1-22.

Decit (Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde). Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev Saúde Pública. 2010; 44(1): 200-202.

Dias, JCP, Neto, VA. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. História sobre a Doença de Chagas no Brasil. 2011; 44 (supl. II): 68-72.

DTAPED (Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa), Centro Bioterismo da FMUSP, Biotério Central. [Acesso em 17 dez. 2016]. Disponível em: http://www.bioterio.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=CAMUNDONGO&id_ani=9&caract=sim

Dutra, PML, Souza, JEO, Ferreira, MA, Sodré, CL. Tripanossomíase Americana. “In”: Alves, PCDC, Poian ATD, Abrahão A. Bases Moleculares em clínica médica. Atheneu. 2010: 203-223.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495–516.

Epting, CL, Coates, BM, Engman, DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology. 2010; 126: 283–291.

Galvão, C, Gonçalves-Gurgel, R.Vetores conhecidos no Brasil. In: Galvão, C.Vetores da Doença de Chagas no Brasil. Série Zoologia: Guias e Manuais de Identificação. Sociedade Brasileira de Zoologia. Curitiba, 2014; 1: 88-170.

Ferreira, M.U. Parasitologia Contemporânea. Guanabara Kooga, 2012.

Figueiredo, F, Rossi, MA, Santos, RR. Evolução da cardiopatia experimentalmente induzida em coelhos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1985; 18(3): 133-141.

Guaneri, AA, Silva-Cardoso, L, Atella, GC. Interação Parasito-Vetor (Tripanossomatídeos). In: Silva-Neto, MAC, Winte, Cr, Termignoni, C (Org.). Tópicos em Entomologia Molecular. 2012; 1: 1-44.

Goldenberg, S, Contreras, VT, Salles, JM, Bonaldo, MC, Franco, MPAL, Linss, J, Lafaille, J, Valle, D, Morel, CM. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1984; 79: 39-44.

Gurgel-Gonçalves, R, Galvão, G, Costa, J, Peterson, AT. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. Journal of Tropical Medicine. 2012: 1-15.

Haag, J, O'hUigin, C, Overath, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. Molecular and Biochemical Parasitology. 1998; 91: 37–49.

Higuchi, ML, Benvenuti, LA, Reis, MM, Metzger, M, Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Cardiovascular Research. 2003; 60: 96–107.

Hussain, H, Krohn, K, Ahmad, VU, Miana, GA, Greend, IR. Lapachol: an overview. Arkivoc. 2007; 2: 145-171.

Kollien, AH, Schaub, GA. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. Parasitology Today. 2000; 16(9): 381-387.

Lopes, AH, Souto-Padrón, T, Dias, FA, Gomes, MT, Rodrigues, GC, Zimmermann, LT, Alves e Silva, TL, Vermelho, AB. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. The Open Parasitology Journal. 2010; 4: 30-59.

Lopes, ER, Chapadeiro, E. Anatomia patológica da doença de chagas humana. "In": Dias, JCP, Coura, JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Fiocruz. 1997; 1: 67-84

Macedo, AM, Oliveira, RP, Pena SDJ. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press, 2002; 4(5): 1-16.

Machado, FS, Jelicks, LA, Kirchhoff, LV, Shirani, J, Nagajyothi, F, Mukherjee, S, Nelson, R Coyle, CM, Spray, DC, Carvalho, ACC, Guan, F, Prado, CM, Lisanti, MP, Weiss, LM, Montgomery, SP, Tanowitz, HB. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. Cardiol Rev. 2012; 20(2): 53-65.

Maia RC, Vasconcelos FC, de Sá Bacelar T, Salustiano EJ, da Silva LF, Pereira DL, Moellman-Coelho A, Netto CD, da Silva AJ, Rumjanek VM, Costa PR. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. Invest New Drugs. 2011; 29(6):1143-1155.

Maioli, TU, Assis.FA, Vieira, PMA,Borellià, P, Santiago, Alves, HR, Romanha, AJ, Carneiro, CM, Faria, AMC. Splenectomy Increases Mortality in Murine *Trypanosoma cruzi* Infection. Scandinavian Journal of Immunology. 2011; 73: 36-45.

Malik, LH, Singh, GD, Amsterdam, EA. The epidemiology, clinical manifestation and management of Chagas Heart Disease. Clin. Cardiol. 2015; 38(9): 565-569.

Markell, E, John, DT, Krotoski, WA. Parasitologia Médica. 8ª ed. Guanabara Koogan, 2003.

Martínez-Díaz, RA, Escario, JA, Nogal-Ruiz, JJ, Gómez-Barrio, A. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(1): 53-59.

Martino T, Magalhães FC, Justo GA, Coelho MG, Netto CD, Costa PR, Sabino KC. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. Bioorg Med Chem. 2015; 22(12): 3115-3122.

Martins-Melo, FR, Ramos Jr, AN, Alencar, CH, Heukelbach, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. Bull World Health Organ. 2016; 94: 103–110.

Meirelhes, MNL, Araujo-Jorge, TC, Souza, W. Dissociation of the Attachment and Internalization Phases by Low Temperature and Cytochalasin B. Z Parasitetenkd. 1982; 68: 7-14.

Menezes, H. The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. V - The effect of immunosuppressive agents in mice. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1971; 5(4): 213-233.

Menna-Barreto, RFS, Castro, SL. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. BioMed Research International. 2014: 1-14.

Menna-Barreto, RFS, Corrêa, JR, Pinto, AV, Soares, MJ, Castro, SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β-lapachone. Parasitol Res. 2007; 101: 895–905.

Menna-Barreto, RFS, Goncalves, RLS, Costa, EM, Silva, RSF, Pinto, AV, Oliveira, MF, Castro, SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radical Biology & Medicine. 2009; 47: 644–653.

Menna-Barreto, RFS, Salomão, K, Dantas, AP, Santa-Rita, RM, Soares, MJ, Barbosa, HS, Castro, SL. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. Micron. 2009; 40: 157–168.

Michels, PAM, Bringaud, F, Herman, M, Hannaert, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. Biochimica et Biophysica Acta. 2006; 1763(12): 1463–1477.

Militão, GCG, Prado, MP, Pessoa, C, Morais, MO, Silveira, ER, Lima, MAS, Velose, PA, Costa-Lotufo, LV, Machado-Santelli. Pterocarpans induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. Biochimie. 2014; 104: 147-155.

Ministério da Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015; 46(21): 1-9.

Minoprio, PM, Eisen, H, Forni, L, D'Imperio Lima, MR, Joskowicz, M, Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand J Immunol. 1986; 24(6): 661-668.

Morillo, CA, Marin-Neto, JA, Avezum, A, Sosa-Estani, S, Rassi Jr., A, Rosas, F, Villena, E, Quiroz, R, Britto, RBC, Guhl, F, Velazquez, E, Bonilla, L, Meeks, B, Rao-Melacini, P, Pogue, J, Mattos, A, Lazdins, J, Rassi, A, Connolly, SJ, Yusuf, S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015; 373: 1295-1306.

Mota, MCM. Kinetoplast as a Potential Chemotherapeutic Target of Trypanosomatids. Current Pharmaceutical Design. 2008; 14: 847-854.

Neves, DF, Melo, AL, Linardi, PM, Vitor, RWA. Parasitologia Humana. 12ª ed. Atheneu, 2011.

Neto, VA. Origin of the "Y strain" of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. 2010; 52(3): 171.

Noord, CV, Eijgelsheim, M, Stricker, BH. Drug- and non-drug-associated QT interval prolongation. British Journal of Clinical Pharmacology. 2010; 70 (1): 16-23.

Novaes, RD, Pwnitente, AR, Gonçalves, RV, Talvani, A, Neves, CA, Maldonado, IRSC, Natali, AJ. Effects of *Trypanosoma cruzi* infection on myocardial morphology, single cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats. Int. J. Exp. Path. 2011; 92: 299-307.

Novaes, RD, Santos, EC, Cupertino, MC, Bastos, DSS, Oliveira, JM, Carvalho, TV, Neves, MM, Oliveira, LL, Talvani, A. *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. Parasitol Res. 2015; 114: 2873-2881.

Ogu, CC. Maxa, JL. Drug interactions due to cytochrome P450. Bumc Proceedings. 2000; 13: 421–423.

Oliveira, AB, Raslan, DS, Miraglia, MCM, Mesquita, AAL. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. Química Nova. 1990; 13(4): 302-307.

Panzera, F, Ferreiro, MJ, Pita, S, Calleros, L, Pérez, R, Basmadjián, Y, Guevara, Y, Brenière, SF, Panzera, Y. Evolutionary and dispersal history of Triatoma infestans , main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. Infection, Genetics and Evolution. 2014; 27: 105-113.

Passos, LAC, Guaraldo, AMA, Barbosa, RL, Dias, VL, Pereira, KS, Schmidt, FL, Franco, RMB, Alves, DP. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília. 2012; 21(2): 223-232.

Pedrique, B, Strub-Wourgaft, N, Some, C, Olliaro, P, Trouiller, P, Ford, N, Pècoul, B, Brado, JH.The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. Lancet Glob Health. 2013; 1: 371–377.

Pérez-Molina, JA, Perez, AM, Norman,FF, Monge-Maillo, B, López-Vélez, R. Old and new challenges in Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2015; 15: 1347–1356.

Peterson, JK, Bartsch, SM, Lee, BY, Dobson, AP. Broad patterns in domestic vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics: synanthropic animals and vector control. Parasites & Vectors. 2015; 8: 1-10.

Pinto, PLS, Takami, R, Nunes, EV, Guilherme, CS, Oliveira Jr., OC, Gama-Rodrigues, J, Okumura, M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. 1999; 54(5): 141-146.

Portes, JB, Netto, DC, Silva, AJM, Costa, PRR, Da Matta, RA, Santos, TAT, Souza, W, Seabra, SH. A new type of pterocarpanquinone that affects Toxoplasma gondii tachyzoites in vitro. Veterinary Parasitology. 2012; 186: 261–269.

Rassi Jr, A, Rassi, A, Marin-Neto, JA. Chagas disease. Lancet. 2010; 375: 1388–1402.

Rey, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Guanabara Koogan, 2008.

Rey, L. Bases da parasitologia médica. 3ª ed. (Reimpresso). Guanabara Koogan, 2013.

Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, da-Silva SA, Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ, Costa PR, Netto CD, Melo RC, Almeida-Amaral EE, Torres-Santos EC. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in Leishmania amazonensis. J Antimicrob Chemother. 2013; 68(4): 789-799.

Sá Bacelar, T, Silva, AJ, Costa, PR, Rumjanek, VM. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. Anticancer Drugs. 2013; 24(1): 73-83.

Salas, CO, Faúndez, M, Morello, A, Maya, JD, Tapia, RA. Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against *Trypanosoma cruzi*: An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease. Current Medicinal Chemistry. 2011; 18: 144-161.

Sangenis, LHC, Sousa, AS, Silva, GMS, Xavier, SS, Machado, CRC, Brasil, P, Castro, L, Silva, S, Georg, I, Saraiva, RM, Brasil, PEAA, Hasslocher-Moreno. Case report: First report of acute chagas disease by vector transmission in Rio de Janeiro state, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 2015; 57(4): 361-364.

Santos, BF. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade, A, Pinto, SC, Oliveira, RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Fiocruz. 2002: 115-118.

Santos, FM, Jansen, AM, Mourão, GM, Jurberg, J, Nunes, AP, Herrera, HM. Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) in the Pantanal region: association with *Trypanosoma cruzi*, different habitats and vertebrate hosts. Rev Soc Bras Med Trop. 2015; 48(5): 532-538.

Sibley, LD. Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites. Immunol Rev. 2011: 240(1): 72–91.

Silber, AM, Tonelli, RR, Lopes, CG, Cunha-e- Silva, N, Torrecilhas, ACT, Schumacher, RI, Colli, W, Alves, MJM. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular & Biochemical Parasitology. 2009; 168: 102–108.

Silva, MN, Ferreira, VF, Souza, MCBV. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados. Quimica Nova. 2003; 26(3): 407-416.

Souza Reis, FR, Faria, FC, Castro, CP, de Souza, PS, Cunha Vasconcelos, F, Bello, RD, Silva, AJ, Costa, PR, Maia, RC. The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. Anticancer Agents Med Chem. 2013; 13(2): 341-351.

Souza, MA, Alencar, AA. On the parasitism of *Trypanosoma cruzi* Y strain in swiss mice. Rev. Inst. Med. Trop. 1984; 26(6): 316-321.

Souza, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(4): 313-325.

Souza, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (supl. I): 89-100.

Souza, W, Carvalho, TMU, Barrias, ES. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology, 2010.

Stanaway, JD, Roth, G. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. Global Heart. 2015; 10(3): 139-144.

Steverding, D. The history of Chagas disease. Steverding Parasites & Vectors. 2014; 7(317): 1-8.

Walker, BD, Silgleton, CB, Brusill, JA, Wyse, KR, Valenzuela, SM, Breit, SN, Campbell, TJ. Inhibition of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channel by cisapride: affinity for open and inactivated states. British Journal of Pharmacology. 1999; 128: 444-450.

World Health Organization (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). [acesso em 2016 Jan]. Disponível em: http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/

World Health Organization (WHO). Neglected tropical diseases: A statistical update-latest data available. 2014

Zingales, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas?. Revista da Biologia. 2011; 6: 44-48.

Zingales, B, Andrade, SG, Briones, MRS, Campbell, DA, Chiari, E, Fernandes, O, Guhl, F, Lages-Silva, E, Macedo, AM, Machado, CR, Miles, MA, Romanha, AJ, Sturm, NR, Tibayrenc, M, Schijman, AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7): 1051-1054.

Zingales, B, Stolf, BS, Souto, RP,Fernandes, O, Briones, MRS. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(supl. I): 159-164.