



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



TANIRA MATUTINO BASTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE
NITROSILO/NITRO COMPLEXOS DE RUTÊNIO EM
MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Feira de Santana, BA
2013

TANIRA MATUTINO BASTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE
NITROSILO/NITRO COMPLEXOS DE RUTÊNIO EM
MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Milena Botelho Pereira Soares

Feira de Santana, BA
2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram durante esses 2 anos de mestrado e contribuíram para um período de muito aprendizado e dedicação. Em especial, à Dra. Milena Botelho Pereira Soares, pela oportunidade de fazer parte da equipe LETI e pela orientação e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/UEFS pela organização e eficiência. Agradeço também ao Professor Alzir Azevedo Batista pela disponibilização dos compostos e a CAPES, pelo apoio financeiro. Além disso, gostaria de agradecer aos colegas do LETI e CBTC pelo convívio e pela contribuição na realização dos experimentos, especialmente ao grupo Chagas (Cássio Meira e Elisalva Guimarães) pelas discussões, sessões e crescimento do grupo, além do auxílio nos diferentes experimentos; a Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira pelo experimento da cruzaina; ao Serviço de Microscopia Eletrônica pelo apoio com microscopia eletrônica; a Danielle Oliveira dos Anjos e Carine Azevedo pela contribuição no experimento de detecção de vacúolos autofágicos. Gostaria de agradecer também a Lucyvera Imbroinise pelo suporte durante o mestrado. Por fim agradeço aos meus familiares e aos queridos amigos, além do meu grande amor, Vinícius, pela compreensão, amizade, companheirismo, alegria (...) enfim, por tudo aquilo que vocês me proporcionam e por existirem na minha vida.

“(...) o laboratório representa em nossa terra uma esperança. Dele esperamos esclarecidos os inúmeros problemas de patologia tropical, que por aí prevalecem obscuros, zombando da sagacidade dos observadores e cujas incógnitas estão repletas das ilações as mais benéficas ao nosso bem-estar.”

Carlos Chagas, 1903.

RESUMO

Os fármacos nifurtimox e benzonidazol têm sido utilizados no tratamento da doença de Chagas desde os anos 70. Ambos podem induzir efeitos colaterais nos pacientes e não possuem eficácia na fase crônica. Portanto, se torna necessária a identificação de medicamentos mais eficientes e menos tóxicos para o tratamento desta doença. A síntese de complexos de metais de transição, especialmente o rutênio, tem sido intensificada ao longo dos anos devido ao interesse nas aplicações biológicas destes compostos. Este estudo teve, como objetivo, avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* dos nitro/nitrosilo complexos de rutênio, *cis*-[RuCl(NO₂)(dppb)(5-me93bipy)] (1), *cis*-[Ru(NO₂)₂(dppb)(5-mebipy)] (2), *ct*-[RuCl(NO)(dppb)(5-mebipy)](PF₆)₂ (3) e *cc*-[RuCl(NO)(dppb)(5-mebipy)](PF₆)₂ (4). Foram avaliadas a citotoxicidade, a atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* e a inibição da atividade enzimática da cruzaina. Foi também avaliado o mecanismo de ação do composto 3, o mais ativo dentre os demais. Os 4 compostos apresentaram baixa citotoxicidade e atividade tripanocida para as três formas evolutivas do parasito. Apenas o composto 1 não inibiu a forma epimastigota. Em relação à atividade enzimática, o composto 2 foi o único que não inibiu a cruzaina. Em relação ao composto 3, os parasitos tratados com este composto apresentaram alterações na membrana e presença de vacúolos correlacionados às marcações positivas para iodeto de propídio e monodansilcadaverina, respectivamente. Além disso, o tratamento proporcionou redução de parasitemia e aumento de sobrevivência dos camundongos infectados. Desta forma, os nitro/nitrosilo complexos de rutênio representam uma classe de fármacos em potencial para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Complexo de rutênio. Óxido nítrico. Atividade tripanocida. Autofagia.

ABSTRACT

Nifurtimox and benznidazole have been used to treat Chagas' disease since the 70s. Both drugs can induce side effects on the patients and are not effective when given during the chronic phase. Therefore, more efficient drugs with lower toxicity are needed for the treatment of this disease. The synthesis of complexes of transition metals, especially ruthenium has been increased over the years due to the interest in the biological applications of these compounds. The present study aimed to evaluate the activity of anti-*Trypanosoma cruzi* of nitro/nitrosyl ruthenium complexes, *cis*-[RuCl(NO₂)(dppb)(5-mebipy)] (1), *cis*-[Ru(NO₂)₂(dppb)(5-mebipy)] (2), *ct*-[RuCl(NO)(dppb)(5-mebipy)](PF₆)₂ (3) and *cc*-[RuCl(NO)(dppb)(5-mebipy)](PF₆)₂ (4). We evaluated the cytotoxicity, anti-*T. cruzi* activity in vitro and in vivo, and inhibition of cruzain enzyme activity. We also evaluated the mechanism of action of compound 3, the most active among the others. All compounds showed low cytotoxicity and trypanocidal activity against the three evolutionary forms of the parasite. Only compound 1 did not inhibit the epimastigote form. Regarding the enzymatic activity, compound 2 was the only one who did not inhibit the cruzain activity. Treatment with compound 3 caused changes in the membrane and vacuoles of the parasites, correlated to positive stains for propidium iodide and monodansylcadaverine, respectively. Moreover, the treatment with compound 3 caused a reduction of parasitemia and increased survival of infected mice. Thus, the nitro/nitrosyl ruthenium complexes represent a potential class of drugs for the treatment of Chagas' disease.

Keywords: Chagas' disease. Ruthenium complex. Nitric oxide. Trypanocidal activity. Autophagy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 GERAL	10
2.2 ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS	11
3.2 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS	12
3.3 TRASMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS	12
3.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS	14
3.5 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS	16
3.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI- <i>T.cruzi</i>	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 COMPLEXOS DE RUTÊNIO	22
4.2 ANIMAIS	25
4.3 PARASITOS	25
4.4 CULTIVO DE PARASITOS	26
4.5 ENSAIOS IN VITRO	26
4.5.1 Obtenção de macrófagos peritoneais	26
4.5.2 Avaliação de citotoxicidade	27
4.5.3 Avaliação da ação tripanocida	27
4.5.4 Infecção de macrófagos peritoneais por <i>T. cruzi</i>	28
4.5.5 Ensaio de inibição enzimática – cruzaina	29
4.5.5.1 Expressão e purificação cruzaina recombinante	29
4.5.5.2 Determinação da atividade inibitória	30
4.5.6 Avaliação de alterações ultraestruturais nos parasitos	31
4.5.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão	31
4.5.6.2 Microscopia eletrônica de varredura	32
4.5.7 Marcação de vacúolos autofágicos	32
4.5.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)	33
4.5.9 Marcação de células apoptóticas e necróticas	33
4.6 ENSAIO IN VIVO	34
4.6.1 Infecção e tratamento	34
4.6.2 Avaliação da parasitemia e mortalidade	34
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5 RESULTADOS	36
5.1 AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA IN VITRO	36
5.1.1 Avaliação da inibição enzimática	39
5.2 AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA IN VIVO	40
5.3 AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA – COMPOSTO 3	42
5.3.1 Avaliação <i>in vivo</i>	42
5.3.2 Avaliação <i>in vitro</i>	44
5.3.2.1 Infecção de macrófagos	44
5.3.2.2 Avaliações de alterações ultraestruturais	46

5.3.2.3	Marcação de vacúolos autofágicos	50
5.3.2.4	Dosagem de NO	52
5.3.2.5	Marcação de células apoptóticas e necróticas	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO	66

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas representam hoje cerca de 90% das enfermidades que acometem a população de países pobres ou em desenvolvimento e é estimado que menos de 10% das pesquisas globais envolvendo saúde são dedicadas a elas (GLOBAL FORUM FOR HEALTH RESEARCH, 2002). Esse descompromisso tem contribuído para a limitada disponibilidade de medicamentos no tratamento de diferentes doenças, como a doença de Chagas (CHAGAS, 1909), uma zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*.

As únicas opções de tratamento existentes por mais de quarenta anos têm sido os fármacos benzonidazol e nifurtimox. Estes medicamentos são considerados mais eficazes na fase aguda da doença, com uma taxa de cura em torno de 80%, e menos eficazes em pacientes que evoluíram para a fase crônica. Além disso, o benzonidazol e o nifurtimox não são considerados medicamentos ideais, uma vez que os seus efeitos colaterais podem ser graves, e já existem relatos de cepas resistentes a estas drogas (CLAYTON, 2010a). Sendo assim, existe uma grande necessidade de novas pesquisas objetivando a identificação de possíveis moléculas com atividade tripanocida, para o tratamento da doença de Chagas, tanto na fase aguda, devido à ocorrência de novos casos em algumas regiões endêmicas da América Latina e em regiões não endêmicas ao redor do globo, quanto na fase crônica, que corresponde à forma mais prevalente da doença e com menores opções de tratamentos disponíveis e eficazes.

Atualmente, as investigações laboratoriais demonstram a atividade tripanocida de novas moléculas em modelos animais. Dentre elas, estão os inibidores de cruzaina não peptídicos, inibidores da enzima esterol 14 α -desmetilase, os novos compostos sintéticos, tais como a arylimidamida DB766, os derivados de nifurtimox, os complexos de rutênio e vários produtos naturais (BUCKNER & NAVABI, 2010).

Em relação aos complexos de rutênio, a aplicação mais recente desta abordagem utilizou esta classe de compostos para fornecer óxido nítrico às células infectadas com o *T. cruzi* (GUEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

O óxido nítrico (NO) tem um papel importante na resistência da célula hospedeira à infecção por protozoários, incluindo o *T. cruzi* (WAGHABI *et al.*, 2005). Tem sido demonstrado, em modelo experimental de fase aguda, que camundongos deficientes na expressão da enzima sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) são suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, proporcionando o aumento da parasitemia e consequente, mortalidade (HOLSCHER *et al.*, 1998).

Com base nos estudos tripanocidas realizados com compostos metálicos e nos conhecimentos sobre a importância do NO no controle da infecção, este trabalho propôs a utilização de nitrosilo/nitro complexos de rutênio para a realização de testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade anti-*T. cruzi*, buscando, assim, uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar novos nitrosilo/nitro complexos de rutênio com atividade anti-*T. cruzi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial citotóxico de quatro complexos de rutênio;
- Verificar a capacidade destes compostos em inibir o crescimento da forma epimastigota em cultura axênica e a viabilidade da forma tripomastigota;
- Avaliar a capacidade dos compostos em inibir a replicação da forma amastigota em macrófagos peritoneais infectados pelo *T. cruzi*;
- Avaliar a capacidade destes complexos de rutênio em inibir a atividade da cruzaiína;
- Avaliar a atividade tripanocida destes complexos em modelo de infecção *in vivo*;
- Verificar a presença de alterações ultraestruturais decorrentes do tratamento *in vitro* do composto mais ativo;
- Avaliar a morte parasitária em decorrência do tratamento com o composto mais ativo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas e seu agente causal foram descobertos no Brasil por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). Os vetores desta doença, mais de 150 espécies de triatomíneos, principalmente dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, foram capazes de transmitir a doença, como uma enzoose, entre as mais de cem espécies de mamíferos, sobretudo de espécies silvestres (marsupiais, quirópteros, roedores, edentados, carnívoros, logomorfos e primatas) por quase dez milhões de anos (revisto por COURA & VIÑAS, 2010).

A chegada dos seres humanos na América e o conseqüente aumento das atividades agrícolas e da domesticação de animais proporcionaram a transmissão acidental de *T. cruzi* na população humana, e a doença de Chagas, por milhares de anos, passou a ser considerada uma antroponose (revisto por COURA & DIAS, 2009).

Evidências da presença de *Triatoma infestans* em habitações humanas em tempos pré-colombianos, como nas culturas Inca e Chinchorro, e a identificação de DNA de *T. cruzi* em múmias encontradas no norte do Chile e sul do Peru, com datações de nove mil anos indicam uma introdução gradual da transmissão domiciliar da doença de Chagas (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004).

Nos últimos 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, além da abertura de vias terrestres de transporte, os insetos silvestres se adaptaram ao ambiente doméstico na procura de nova fonte alimentar, a exemplo do sangue de animais domésticos e de seres humanos. Deste modo, um novo ciclo de infecção foi estabelecido e a doença de Chagas passou a ser classificada como uma zoonose, isto é, uma doença que se transmite entre animais e seres humanos endemicamente (revisto por ZINGALES, 2011).

3.2 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A infecção chagásica apresenta duas fases bem distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo elas: assintomática, oligossintomática ou sintomática. Na forma sintomática observa-se a presença de adenomegalia, hepatoesplenomegalia, alteração bipalpebral unilateral (sinal de Romana), miocardite e meningoencefalite (revisto por COURA, 2003). A fase aguda pode levar a mortalidade em até 10% dos casos graves, principalmente por meningoencefalite, sendo que, esta manifestação clínica é quase sempre fatal nos menores de dois anos de idade, segundo observações de próprio Carlos Chagas (CHAGAS, 1916).

Após um período de latência de 10 a 15 anos, no qual os indivíduos permanecem assintomáticos na chamada forma indeterminada, em torno de 40 a 50% dos pacientes podem evoluir para os três tipos principais de doença crônica (forma cardíaca, digestiva ou mista). A forma cardíaca é caracterizada por miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita, por arritmia cardíaca. Já a forma digestiva é caracterizada pela presença de megaesôfago e megacólon, ou seja, aumento exagerado do esôfago ou cólon por contração dos esfíncteres correspondentes. A forma mista é caracterizada pela presença da forma cardíaca e digestiva, simultaneamente (revisto por COURA, 2003).

3.3 TRASMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

Classicamente, a doença de Chagas é transmitida pela via vetorial (CHAGAS, 1909), ou seja, através das fezes de triatomíneos contendo a forma tripomastigota metacíclica do parasito. O triatomíneo se infecta através do repasto sanguíneo, alimentando-se do sangue de um mamífero infectado com a forma tripomastigota sanguícola. Dentro do inseto, o parasito se diferencia em epimastigota e se replica no intestino do vetor por divisão binária. Antes de emergir em suas fezes a forma epimastigota é diferenciada em tripomastigota metacíclica (revisto por GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

Quando o triatomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo, ele defeca na pele da vítima, depositando *T. cruzi* junto às fezes. O parasito também é capaz de penetrar no novo hospedeiro através de cortes e abrasões na pele ou através dos olhos ou da boca (revisto por GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

O parasito pode infectar macrófagos e uma variedade de outras células, com predominância de células do baço, fígado, linfonodos, tecido conjuntivo intersticial, miocárdio ou músculos esqueléticos. A forma intracelular e replicativa nos mamíferos, amastigota, se multiplica nos tecidos formando pseudocistos que se rompem liberando as tripomastigotas sanguícolas na corrente sanguínea. Alguns parasitos, sob a forma de tripomastigota, recirculam e voltam a se localizar em outras células, reiniciando o ciclo (revisto por COURA, 2003) (Figura 1).

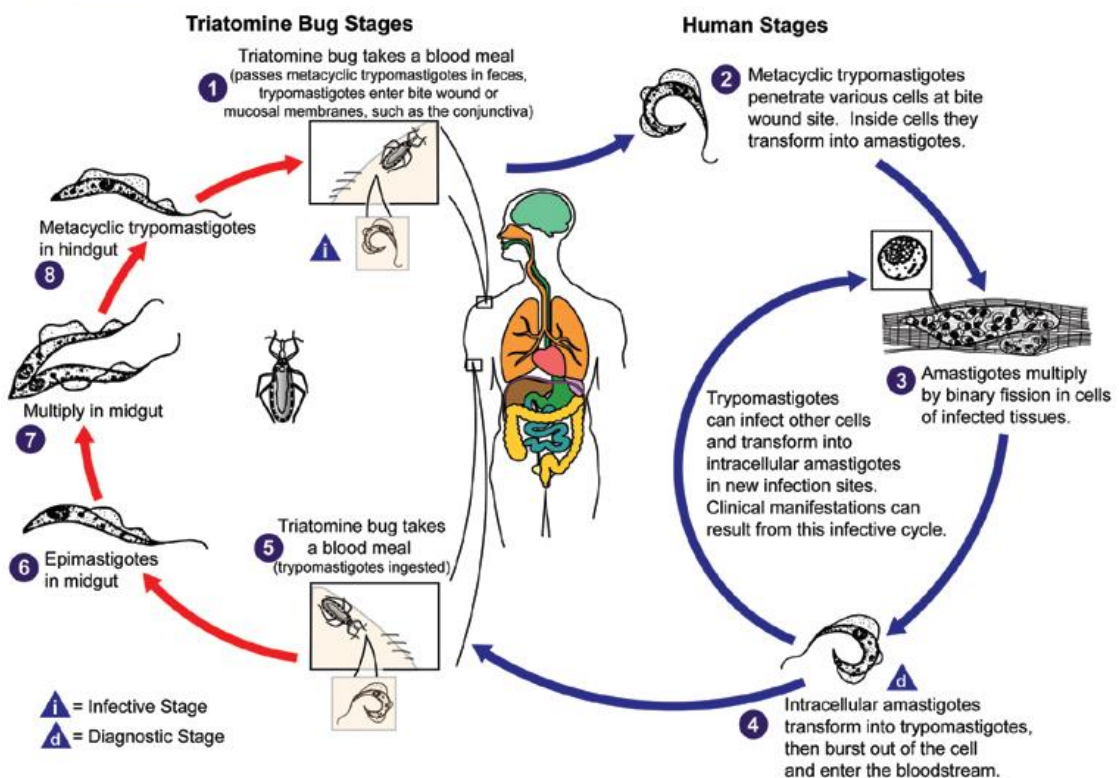


Figura 1 – Ciclo de vida do *T. cruzi*, o agente causal da doença de Chagas.
Fonte: Center for Disease Control and Prevention.

Nos últimos anos, a maioria dos novos casos da doença de Chagas está relacionada às transmissões pelas vias oral, congênita e por transfusão de sangue. No Brasil a via oral representa a principal forma de infecção atualmente. Também

são formas de transmissão o acidente de laboratório, a manipulação de animais infectados, o transplante de órgãos e o ato sexual (feridas, esperma ou fluidos menstruais) (COURA, 2007).

3.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A Organização Mundial de Saúde estima que existam 10 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica. Estima-se que mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de doença e que, em 2008, esta doença tenha matado mais de 10.000 pessoas. (OMS, 2010).

No Brasil, atualmente, predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente 3 milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda tem sido observada principalmente nos estados da Amazônia Legal, com casos isolados em outros estados. No período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda. Destes, 70% (877/1.252) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (92/1.252), e em 22% (276/1.252) dos casos não foi identificada a forma de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Casos agudos resultantes da contaminação oral têm sido documentados por surtos em diferentes localidades, com maior frequência na região amazônica, onde o fruto do açazeiro é uma importante fonte de contaminação (revisto por MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Outros casos de contaminação por via oral também já foram documentados na Venezuela, Guiana Francesa e nas regiões nordeste e sul do Brasil (revisto por ZINGALES *et al.*, 2012). Em 2007, em uma escola em Caracas, Venezuela, 103 crianças foram infectadas com o consumo de suco de goiaba contaminado. Destas, 75 apresentaram sintomatologia para doença de Chagas aguda e uma criança veio a óbito (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010). No Brasil, em 2005, 24 casos agudos da doença foram registrados em Santa Catarina, e todos eles foram relacionados com a ingestão de caldo de cana contaminado com o parasito (STEINDEL *et al.*, 2008).

A doença de Chagas endêmica na América Latina começou como uma doença negligenciada de populações pobres e rurais. A urbanização da população rural na América Latina fez com que a doença de Chagas se tornasse um importante problema de saúde pública, introduzindo novos riscos, tais como a possibilidade de transmissão de *T. cruzi* por meio de transfusão sanguínea (revisto por COURA & VIÑAS, 2010).

No Brasil, em 2010, a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 57 passou a determinar a triagem sorológica para a doença de Chagas nas transfusões sanguíneas. Atualmente os bancos de sangue estão controlados no Brasil e em muitos outros países da América Latina. Entretanto, o sangue infectado ainda é um grande problema na Bolívia, onde, em cidades como Santa Cruz de la Sierra e Cochabamba, até a metade de doadores de sangue podem estar infectados com o *T. cruzi* (revisto por COURA & VIÑAS, 2010).

O aumento da migração da população no mundo mudou o cenário da distribuição da doença de Chagas, principalmente entre os países não endêmicos. O movimento populacional dos países endêmicos para os países não endêmicos, além da possibilidade de transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue, transplante de órgãos e via congênita, favoreceram a entrada do *T. cruzi* em diferentes regiões geográficas, incluindo a América do Norte (Estados Unidos e Canadá), oeste do Pacífico (principalmente Japão e Austrália) e, mais recentemente, Europa (sobretudo a Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça, e, em menor grau Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia) (SCHMUNIS, 2007).

Estima-se que mais de 300.000 indivíduos estejam infectados com o *T. cruzi* nos Estados Unidos, mais de 5.500 no Canadá, mais de 80.000 na Europa e na região do Pacífico ocidental, mais de 3.000 no Japão e mais de 1.500 na Austrália (Figura 2) (SCHMUNIS, 2007).

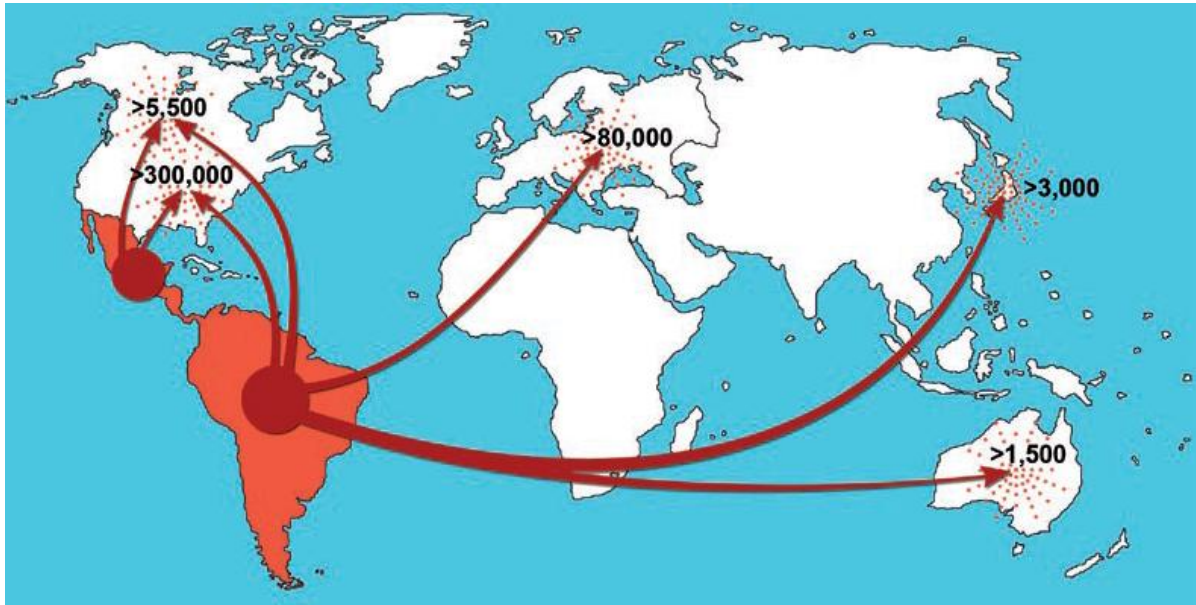


Figura 2 – Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos.
Fonte: COURA & VIÑAS, 2010.

Esses movimentos populacionais começaram a criar novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos, uma vez que em decorrência do novo cenário de distribuição da doença de Chagas, a necessidade de melhorar o sistema de vigilância sanitária, com triagem sorológica nos bancos de sangue e controle no transplante de órgãos, além da inclusão do diagnóstico diferencial e tratamento específico para a doença de Chagas nos países não endêmicos se torna urgente (COURA & VIÑAS, 2010).

3.5 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

Existe uma urgente necessidade de mais opções de tratamento para a doença de Chagas. Os medicamentos existentes, benzonidazol e nifurtimox (figura 3), foram introduzidos na clínica há mais 40 anos atrás e apresentam eficácia limitada no tratamento da fase crônica da infecção (revisado por COURA, 2003). Além disso, já existem casos de cepas resistentes aos medicamentos na infecção aguda, que requer longos períodos de tratamento (60 dias para o benzonidazol e até 90 dias para nifurtimox). A deficiência no sistema de saúde de muitas comunidades

rurais e pobres, em países endêmicos, também contribui para a redução da eficácia do tratamento e o favorecimento de mecanismos de resistência aos medicamentos, em decorrência da infraestrutura limitada e da falta de suporte para oferecer o tratamento completo aos pacientes (CLAYTON, 2010b). Ambos os medicamento podem causar efeitos colaterais potenciais, incluindo erupções cutâneas, náuseas e insuficiência renal e hepática, além de convulsões e outros distúrbios do sistema nervoso que o nifurtimox também pode causar (revisto por CLAYTON. 2010b).

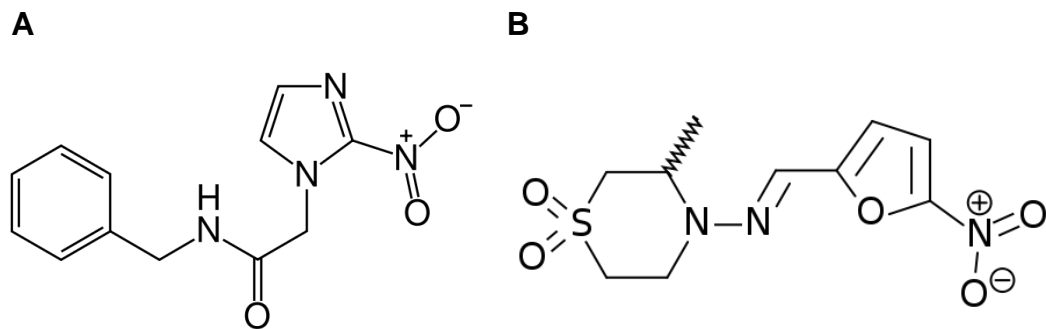


Figura 3 – Estrutura química dos medicamentos benznidazol (A) e nifurtimox (B)

O benznidazol, um derivado 2-nitroimidazólico, e o nifurtimox, um derivado 5-nitrofurano, fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e apresentam diferentes mecanismos de ação contra o *T. cruzi*. A ação tripanocida do nifurtimox deve-se a redução metabólica do grupo nitro gerando radicais nitroânion muito reativos e tóxicos ao parasito (DOCAMPO & STOPANI, 1979). Acredita-se que o mecanismo de ação do benznidazol está envolvido com a ligação covalente de seus intermediários nitroreduzidos a vários componentes celulares como DNA, proteínas e lipídios, provocando a inibição do crescimento dos parasitos (DIAS DE TORANZO *et al.*, 1988).

3.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-*T. cruzi*

Investigações bioquímicas e fisiológicas comparativas entre o parasito e o hospedeiro representam uma interessante abordagem racional na quimioterapia antiparasitária. A identificação de diferenças em processos metabólicos essenciais ao parasito, mas não no hospedeiro, permite a inibição seletiva ao parasito, com consequente redução dos possíveis efeitos adversos do tratamento (revisto por SOEIRO & de CASTRO, 2011).

Além da determinação de alvo(s) específico(s) identificado(s) em vias metabólicas chave para o parasito, outros métodos também estão sendo utilizados na busca de novas quimioterapias para as doenças parasitárias. Dentre eles, o reposicionamento de fármacos, ou seja, o uso de fármacos já aprovados no tratamento de outras doenças, uma vez que já foram submetidos a ensaios clínicos dispendiosos (revisto por CLAYTON, 2010b) e a terapia combinada (COURA, 2009).

Estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais em *T. cruzi*, que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas, tais como as cisteíno-proteases (revisto por SOEIRO & de CASTRO, 2011). O *T. cruzi* possui uma cisteíno-protease semelhante à L-catepsina denominada de cruzipaína (ou cruzaína), que é a principal responsável pela atividade proteolítica envolvida em vários processos vitais, em todos os estágios do ciclo evolutivo do parasito (SCHARFSTEIN *et al.*, 1986; CAMPETELLA *et al.*, 1990; SOUTO-PADRON *et al.*, 1990).

É descrito na literatura que a cruzaína parece ser importante para a sobrevivência do parasito, para o seu crescimento e diferenciação celular (DOS REIS *et al.*, 2006; MCKERROW *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que esta enzima desempenha papel importante no processo de internalização do parasito em células de mamíferos (SOUTO-PADRON *et al.*, 1990) e na replicação intracelular do *T. cruzi* (MEIRELLES *et al.*, 1992).

Diante da importância desta enzima, a inibição da cruzaína do *T. cruzi* tem sido proposta como uma abordagem terapêutica para o tratamento da doença de Chagas. Entre os inibidores da cruzaína, o composto K777 apresentou atividade tripanocida *in vitro*, bloqueando a proliferação de ambas as formas replicativas do parasito, epimastigota e amastigota, além da metaciclogênese (diferenciação de

epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas). Este composto também foi capaz de reduzir os níveis de parasitemia e prolongar a sobrevivência de camundongos infectados em modelos de infecção aguda e crônica da doença de Chagas, com mínima de toxicidade (ENGEL *et al.*, 1998).

Além da cruzaina, outras enzimas têm importância fundamental na sobrevivência do parasito e representam alvos atraentes na síntese de inibidores para a terapia anti-chagásica. Dentre elas, a tripanotona redutase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, a diidrofolato redutase, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e as enzimas da síntese de esteróis, como C14 α -esterol desmetilase, esqualeno sintetase e oxidosqualeno ciclase (revisto por SOEIRO & de CASTRO, 2011). Ensaio pré-clínicos com diferentes inibidores têm sido realizados, mas o potencial clínico destes compostos só poderá ser determinado a médio e longo prazo (10-15 anos) (revisto por URBINA, 2010).

Dentre os compostos testados contra o *T. cruzi* nas últimas três décadas, os inibidores da biossíntese de ergosterol são considerados bons candidatos no desenvolvimento da nova terapia para a doença de Chagas. Dentre os mais promissores estão alguns novos derivados de triazol que são capazes de inibir a enzima C14 α -esterol desmetilase do parasito. Os ensaios pré-clínicos de dois deles, posaconazol e ravuconazol, demonstram atividade anti-*T. cruzi* promissora. Como resultado, o posaconazol e um pró-fármaco do ravuconazol (E1224) estão sendo avaliados em estudos clínicos de fase II para a doença de Chagas (revisto por BUCKNER & URBINA, 2012). Apesar de promissores, o elevado custo para a fabricação destes compostos pode representar um obstáculo na terapia da doença de Chagas (revisto por URBINA, 2010).

Os compostos de coordenação, assim como o rutênio, mostram-se promissores agentes terapêuticos, exibindo interessantes propriedades farmacológicas para aplicações metalofarmacêuticas (revisto por TFOUNI *et al.*, 2012). Assim, a síntese de novos complexos de rutênio, especialmente os doadores de NO, representa uma alternativa interessante para o tratamento da doença de Chagas (NAPOLI & IGNARRO, 2003), uma vez que é descrita na literatura a atividade tripanocida de clássicos doadores de NO, como SNAP (S-nitroso-acetilpenicilamina) e SNP (nitroprussiato de sódio) como efeito do NO gerado (BOCEDI *et al.*, 2004).

As concentrações fisiopatológicas de NO produzidas durante a fase inicial da infecção aguda da doença a partir dos macrófagos podem participar da morte parasitária por mecanismos dependentes de NO (VESPA *et al.*, 1994). A infecção aguda da doença de Chagas induz o aumento de IL-12 e TNF- α , proporcionando a produção de IFN- γ e a consequente expressão de iNOS, ou seja, a ativação de síntese de NO que possui atividade tripanocida (GAZZINELLI *et al.*, 1992; CARDILLO *et al.*, 1996). Já a inibição de iNOS reduz o efeito tripanocida, sugerindo que o NO tem efeito inibitório no crescimento do parasito (SILVA *et al.*, 1995; CARDILLO *et al.*, 1996).

Tem sido descrito na literatura o uso de diferentes complexos de rutênio doadores de NO na terapia da doença de Chagas (GUEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). GUEDES *et al.*, 2010 descrevem a redução da carga parasitária e da inflamação cardíaca, além da sobrevivência de 100% dos camundongos tratados com o composto *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas. Em relação aos ensaios *in vitro*, este composto apresentou atividade 10 e 100 vezes superior em relação ao benzonidazol quando testados em amastigotas e tripomastigotas, respectivamente.

SILVA *et al.* (2010) descreveram a atividade anti-*T.cruzi* de diferentes complexos de rutênio e sugeriram que os compostos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L](PF₆)_n são eficazes agentes tripanocidas por um mecanismo envolvendo a S-nitrosilação da Cys 166 presente no sítio ativo da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do parasito. SILVA *et al.* (2009) descreveram outra classe de complexos de rutênio, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺, e também demonstraram a atividade tripanocida de alguns destes compostos, tais como o [Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃. Os resultados *in vivo* demonstram ausência de ninhos de amastigota no tecido do miocárdio e sobrevivência dos animais tratados com a dose de 400 nmol/kg/dia, durante 15 dias. SILVA *et al.* (2007) sugerem que o NO liberado após redução dos nitrosilos complexos de rutênio *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ é o agente terapêutico responsável pela atividade tripanocida destes compostos.

A estratégia do uso de doadores de NO na terapia da doença de Chagas deve ser estudada com cautela, uma vez que os elevados níveis de NO podem modificar o metabolismo celular normal, causando danos ainda não bem caracterizados para a célula hospedeira (MARTINS *et al.*, 1998; BONAVIDA *et al.*,

2006). SILVA *et al.* (2009) observaram um aumento paradoxal no número de parasitos presentes no tecido miocárdico quando doses mais elevadas foram utilizadas no tratamento dos camundongos infectados com o *T. cruzi*. Este parasitismo aumentado reforça a idéia de que muitas questões importantes devem ser abordadas antes que esta estratégia terapêutica seja utilizada clinicamente, principalmente que relação à biodisponibilidade oral e segurança.

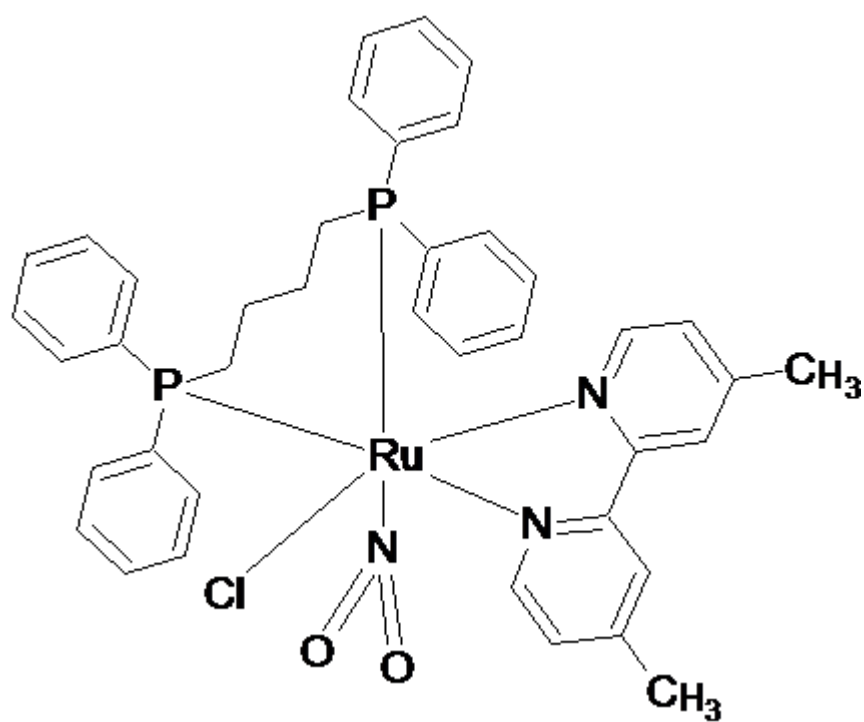
Assim, interações interdisciplinares dos diferentes campos da ciência, desde a genética, a biologia celular e molecular, a química, a bioinformática e a farmacologia, são necessárias para o desenvolvimento e/ou identificação de fármacos eficazes, sem (ou com baixa) toxicidade e com baixo custo de produção para serem utilizados no tratamento da doença de Chagas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

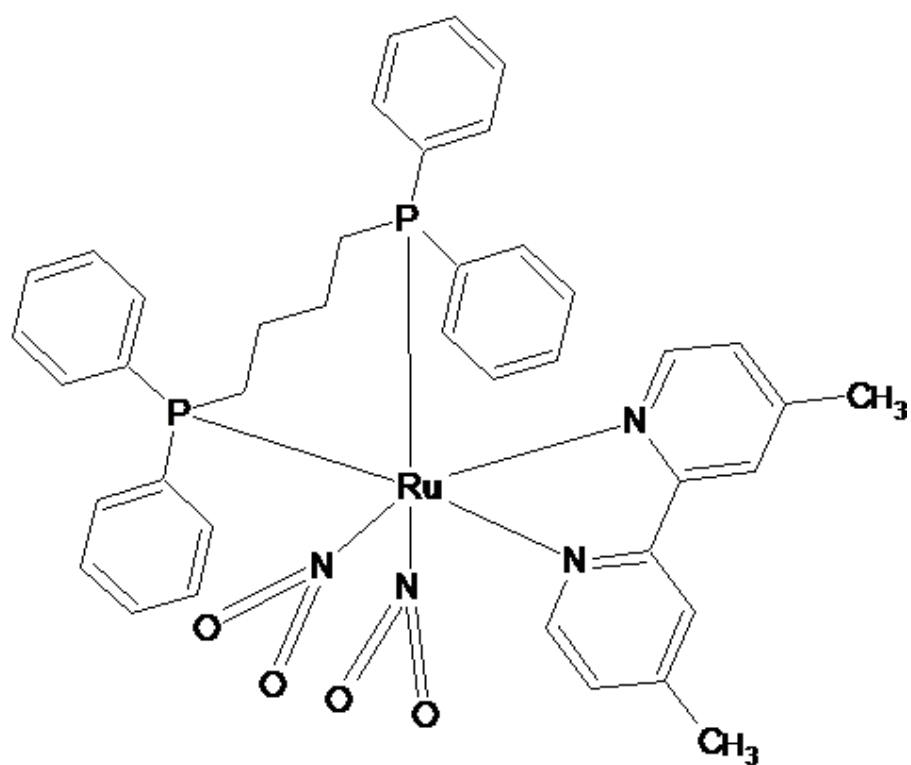
4.1 COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Os complexos de rutênio $\text{cis-[RuCl(NO}_2\text{)(dppb)(5-mebipy)]}$ (composto 1), $\text{cis-[Ru(NO}_2\text{)}_2\text{(dppb)(5-mebipy)]}$ (composto 2), $\text{ct-[RuCl(NO)(dppb)(5-mebipy)](PF}_6\text{)}_2$ (composto 3) e $\text{cc-[RuCl(NO)(dppb)(5-mebipy)](PF}_6\text{)}_2$ (composto 4) onde dppb = 1,4-*bisdifenilfofinabutano*, 5-mebipy = 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (Figura 4), foram obtidos do Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos – LERCI, no departamento de química da Universidade Federal de São Carlos, em uma colaboração com o grupo chefiado pelo prof. Alzir Azevedo Batista.

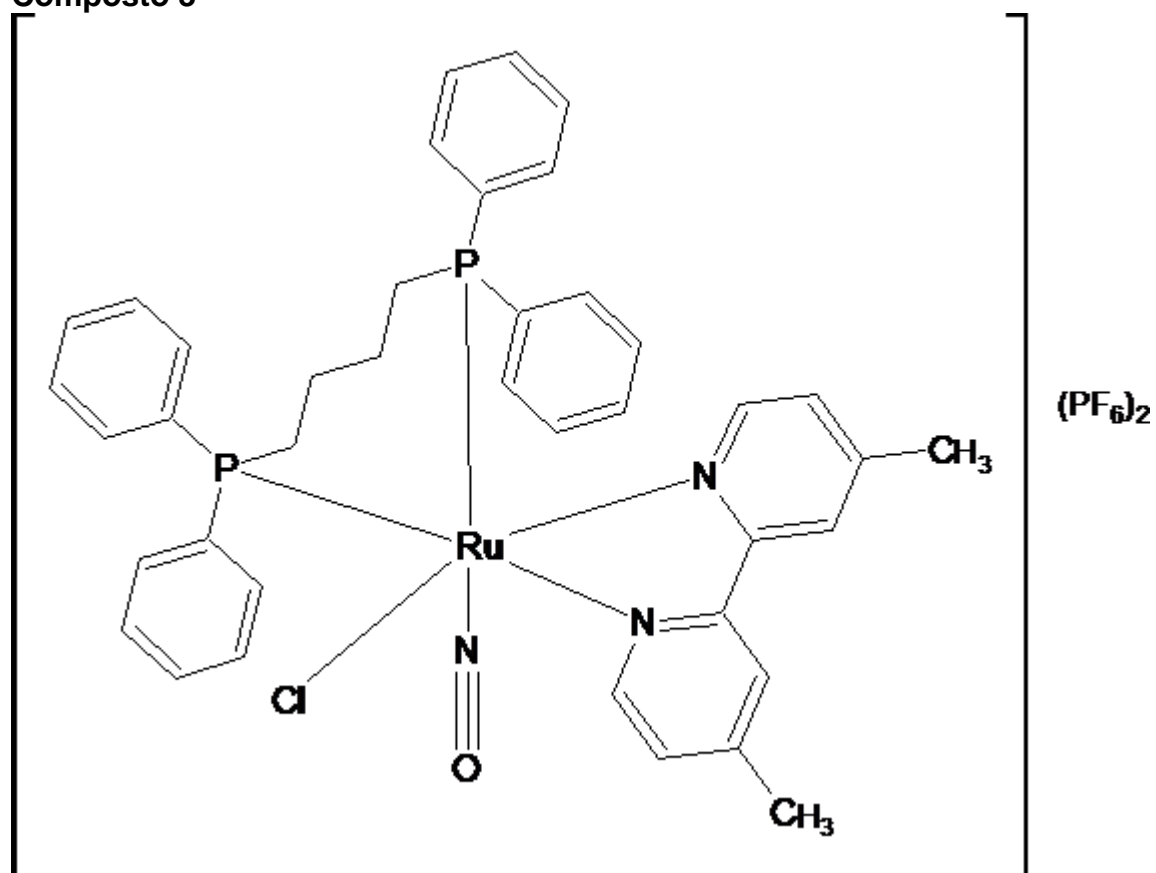
Composto 1



Composto 2



Composto 3



Composto 4

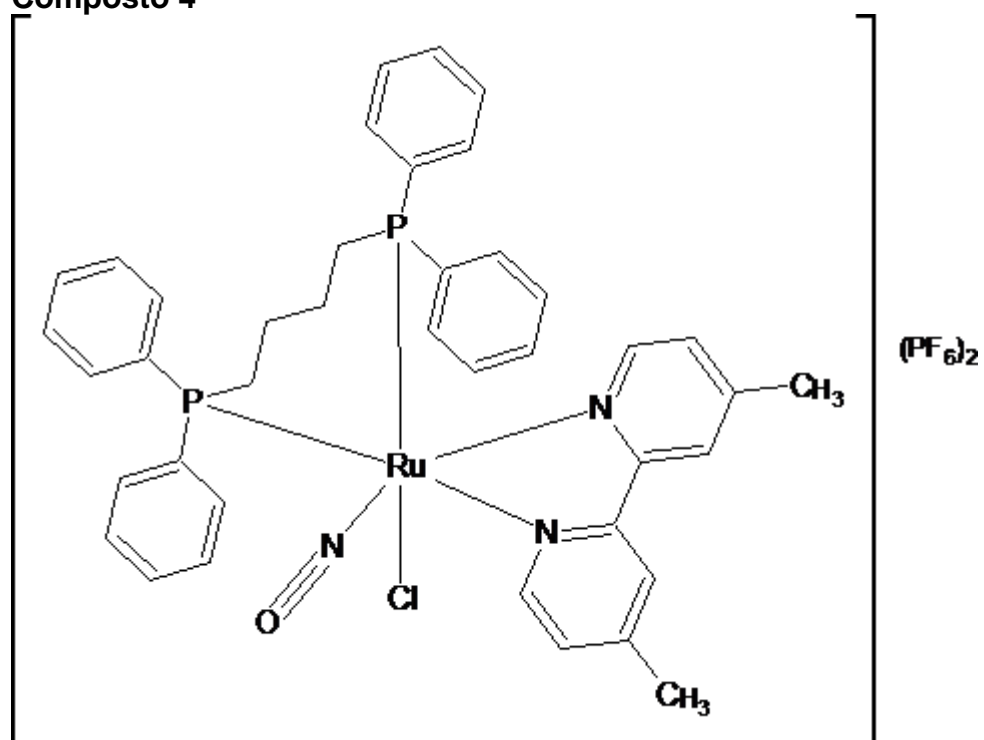


Figura 4: Estrutura química dos complexos de rutênio avaliados neste estudo.

O complexo de rutênio 1 é o composto protótipo, uma vez que foi utilizado como molécula base para a síntese dos demais compostos. As variações entre os diferentes complexos de rutênio estão na presença ou ausência do grupo nitro/nitrosol e do átomo de cloro. O composto 1 apresenta um grupo nitro e um átomo de cloro. Já no composto 2, o átomo de cloro foi substituído por um grupo nitro e, portanto, apresenta dois grupos nitro como substituintes. A partir do composto 1, para a síntese dos compostos 3 e 4, houve substituição do grupo nitro para o grupo nitrosilo. A diferença entre os compostos 3 e 4 está na localização do NO. No composto 3, o NO está na posição *cis* ao cloro e *trans* ao fósforo. Já no composto 4, o NO está *cis* ao cloro e *cis* ao fósforo.

4.2 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 200 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c, fêmeas, com o peso variando entre 18 e 20 g, provenientes do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em condições de alimentação *ad libitum* e livres de patógenos. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ/CPqGM), projeto nº.002/2011.

4.3 PARASITOS

Os parasitos na forma epimastigota da cepa Y foram obtidos de amostras criopreservadas e armazenadas no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI - CPqGM - FIOCRUZ) por sucessivas passagens *in vitro*. Já os parasitos na forma tripomastigota da cepa Y foram coletados do sangue de animais da linhagem BALB/c infectados por via intraperitoneal sete dias pós-infecção.

4.4 CULTIVO DE PARASITOS

Parasitos na forma tripomastigota foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®, Grand Island, NE, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), juntamente com células da linhagem LLC-MK2 (células de rim de macaco rhesus) e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por sete dias.

As formas epimastigotas do *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (“liver infusion tryptose”) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 1% de hemina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma) e mantidos em estufa a 26 °C por 11 dias.

4.5 ENSAIOS *IN VITRO*

4.5.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

Macrófagos do exsudato peritoneal foram obtidos de camundongos da linhagem BALB/c, a partir da indução de inflamação através da injeção de tioglicolato a 3% (Sigma). Após cinco dias da indução, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de gás de dióxido de carbono e, sob condições estéreis, a pele da região abdominal foi retirada para a visualização do peritônio. Foram injetados 10 mL de solução salina na cavidade peritoneal dos animais, e, após uma massagem no abdômen, os macrófagos foram coletados com auxílio de uma seringa. As células foram centrifugadas a 1500 RPM (363 x g) por 10 minutos, contadas e plaqueadas para os ensaios de citotoxicidade e de infecção de macrófagos.

4.5.2 Avaliação de citotoxicidade

A determinação da concentração letal para 50% da população celular (LC_{50}) foi realizada através do ensaio de Alamar Blue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os macrófagos peritoneais (10^5 /poço) foram cultivados em placa de cultura de 96 poços e incubados em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Posteriormente, os compostos em diferentes concentrações (100; 33,33; 11,11; 3,70 e 1,23 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados e incubados por seis horas nas mesmas condições de temperatura e umidade. Após este período de incubação, os poços foram lavados com salina e, em seguida, foi adicionado o reagente Alamar Blue (Invitrogen) na concentração de 10%. Os macrófagos foram incubados por mais 24 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras colorimétricas da placa de 96 poços com os comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O cálculo para a obtenção do valor de LC_{50} foi efetuado, utilizando-se regressão não linear no programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Apenas o composto 3, que apresentou a atividade tripanocida mais ativa, foi testado em outras concentrações (25, 10, 5 e 1 μM) por 96 horas.

4.5.3 Avaliação da ação tripanocida

Parasitas na forma epimastigota (10^7 parasitos/poço) foram incubados em placa de 96 poços, em triplicata, em meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 1% de hemina (Sigma), 1% de meio R9 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma) a 26°C, na presença dos compostos em teste em diferentes concentrações (100; 33,33; 11,11; 3,70; 1,23 e 0,41 $\mu\text{g/mL}$). Após o quinto dia de incubação, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer.

Os compostos também foram testados na forma tripomastigota. Neste ensaio, os parasitos (4×10^5 tripomastigotas/poço) foram incubados em placa de 96 poços, em triplicata, em meio de cultura RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma) na presença dos

compostos em diferentes concentrações (100; 33,33; 11,11; 3,70; 1,23 e 0,41 µg/mL). Após 24 horas de incubação, os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer.

As diferentes concentrações dos compostos foram avaliadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% o crescimento ou a viabilidade dos parasitos (IC_{50}). O valor da IC_{50} foi determinado com base na porcentagem de inibição do crescimento do parasito para a forma epimastigota e na inibição da viabilidade parasitária para a forma tripomastigota. O cálculo para a obtenção do valor de IC_{50} foi efetuado, utilizando-se regressão não linear no programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software). O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi o benzonidazol (Rochagan®).

4.5.4 Infecção de macrófagos peritoneais por *T. cruzi*

Foi avaliada também a ação tripanocida dos compostos para a forma amastigota. Os macrófagos estimulados por tioglicolato 3% (Sigma) obtidos por lavagem peritoneal foram incubados em placa de 24 poços em uma concentração de 2×10^5 células/poço em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, os macrófagos foram infectados com 2×10^6 tripomastigotas/poço por duas horas. Em seguida, os poços foram lavados e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações (25, 10, 5 e 1 µM). Após seis horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os poços foram lavados com solução salina e mantidos com meio de cultura em estufa, nas mesmas condições, por quatro dias. As células infectadas foram fixadas em álcool etílico absoluto, por dez minutos, as lamínulas foram coradas por hematoxilina e eosina e montadas em lâminas com Entellan (Entellan®, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Foram avaliados o número de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas por macrófagos. A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão). O benzonidazol foi utilizado como controle positivo do experimento, enquanto o controle negativo correspondeu às células infectadas com os parasitos. O valor de IC_{50} para a forma amastigota foi realizado utilizando como

parâmetro a quantidade de amastigotas por macrófagos através da regressão não linear no programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software).

Com o objetivo de verificar a ação do composto 3 de forma mais tardia, foi realizado um ensaio alternativo de infecção de macrófago apenas com este composto nas concentrações de (25, 10, 5 e 1 μM). Para este ensaio, foram também utilizados macrófagos peritoneais elicitados de camundongos BALB/c estimulados com tioglicolato (3%) (Sigma). Os macrófagos (2×10^5) foram incubados em placas de 24 poços e mantidos em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Após este período, os macrófagos foram infectados com 2×10^6 tripomastigotas/poço por duas horas. Os poços foram lavados e mantidos nas mesmas condições de temperatura e umidade por 48 horas. Em seguida, o composto foi adicionado nas diferentes concentrações e a placa foi mantida em estufa por mais 96 horas. As células foram fixadas e as lâminas foram montadas de forma semelhante ao experimento anterior. Foram também avaliados o número de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas por macrófagos. O fármaco benzonidazol foi utilizado como controle positivo, enquanto as culturas sem tratamento constituíram o controle negativo.

Os ensaios de citotoxicidade e de infecção de macrófagos foram realizados utilizando as mesmas condições de concentração dos compostos e tempos de incubação com o objetivo de avaliar o índice de seletividade (IS) dos compostos, ou seja, para avaliar quão seletivo o composto é ao parasito em relação às células de mamífero.

$$\text{IS} = \text{LC}_{50} \div \text{IC}_{50} (\text{amastigota})$$

4.5.5 Ensaio de inibição enzimática - cruzaina

4.5.5.1 Expressão e purificação cruzaina recombinante

A bactéria BL21(DE3)pLysS foi transformada com o plasmídeo pChey Tc Delta (gentilmente cedido ao nosso grupo pelos doutores James Hobson McKerrow

e Anna Tochowicz - University of California in San Francisco, School of Medicine, Department of Pathology, USA). O lisado das bactérias transformadas foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) através do cromatógrafo Akta purifier10 (GE Healthcare Life Sciences) para purificação da cruzaina recombinante.

4.5.5.2 Determinação da atividade inibitória

A cruzaina recombinante foi ativada em tampão acetato (0,1 M; pH 5,5) contendo 50 μM de DTT e 0,01 % de triton-X. A enzima foi ajustada para obter uma concentração final de 5 ng nos poços. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços opacas (96 Thermo Electron CliniPlate). No ensaio de competição, 60 μL de uma solução de cada potencial inibidor químico (complexos de rutênio, 100 μM) e 20 μL da enzima foram adicionados nos respectivos poços e a reação foi incubada por 30 minutos a 35 °C. Após esse tempo, adicionou-se 80 μL do substrato Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (1,5 μM) e a reação foi incubada por 10 minutos. Em ambos os experimentos, a placa foi lida no fluorímetro EnVision (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) (λ excitação = 380 nm e λ emissão = 460 nm) em diferentes tempos reacionais. A porcentagem de inibição da cruzaina foi calculada usando a equação $100 - (A1/Ax100)$, onde A1 corresponde a fluorescência relativa (RFU) da enzima na presença do inibidor químico e A corresponde a RFU da enzima na ausência do inibido químico (DMSO e substrato fluorescente) e a média de cada duplicata foi calculada. Como controle positivo foi utilizado o inibidor químico E64-c (Sigma). Uma curva concentração-resposta foi determinada variando-se as concentrações do inibidor químico entre 1,5 nM até 100 μM . A curva concentração-resposta foi determinada usando ao menos oito pontos e a IC_{50} foi estimada usando regressão não linear no programa OriginPro versão 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

4.5.6 Avaliação de alterações ultraestruturais nos parasitos

4.5.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise de alterações ultraestruturais da forma tripomastigota, os parasitos (6×10^6 parasitos/mL) foram incubados na presença do composto mais ativo (3) na concentração de IC_{50} ($2,1 \mu M$), durante 24 horas em estufa umidificada à $37^\circ C$ e 5% de CO_2 . Após este período, a suspensão contendo os parasitos foi centrifugada (3000 RPM [$1,452 \times g$] por 10 minutos), o pellet foi lavado em solução salina e encaminhado para o processamento.

Foi também realizada a análise de alterações ultraestruturais de macrófagos infectados com o parasito. Para esta análise, macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato 3% (Sigma) foram incubados em placa de seis poços na concentração de 3×10^6 células/poço em estufa umidificada à $37^\circ C$ e 5% de CO_2 por 24 horas. Após este período, os macrófagos foram infectados com 3×10^7 tripomastigotas/poço por duas horas. Em seguida, os poços foram lavados com salina e o composto 3 foi adicionado. Após seis horas de incubação em estufa a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 , as células foram obtidas através da raspagem dos poços com o uso do “scraper” (raspador) de células, lavadas com solução salina e encaminhadas para o processamento de células livres.

Os parasitos e as células infectadas foram processados de forma semelhante. Estes foram fixados por uma hora em temperatura ambiente com formaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, o material foi lavado três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), pós-fixados com uma solução de tetróxido de ósmio (Sigma) 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Subsequentemente, o material foi desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, e 100%) e incluído em resina Polybed (Polysciences, Washington, PA, EUA) e acetona (1:1). Após o período de 24 horas, a resina, desta vez, pura, foi trocada e mantida por seis horas. Uma nova troca de resina foi realizada e o material foi mantido em estufa a $60^\circ C$ por 72 horas para que essa fosse polimerizada. Cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo Leica UC7

(Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemanha) e coletados em grades de cobre com 300 malhas, contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1230) a 15 kV na unidade de serviço de microscopia eletrônica - SME do CPqGM – FIOCRUZ.

4.5.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

Parasitos na forma tripomastigota (6×10^6 parasitos/mL) foram submetidos ao tratamento com o composto 3 na concentração de IC_{50} (2,1 μ M) e mantidos durante 24 horas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO_2 . Após este período, os parasitos foram obtidos a partir da centrifugação (3000 RPM [$1,452 \times g$] por 10 minutos), lavados em solução salina e fixados por uma hora à temperatura ambiente com formaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e aderidas em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina (Sigma). Após a aderência, os parasitos foram pós-fixados com uma solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Em seguida, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, e 100%), submetidas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV a 12 kV em unidade de microscopia eletrônica - UME do CPqGM – FIOCRUZ.

Foram realizadas quantificações (100 parasitos/grupo) para as principais alterações ultraestruturais observadas (encolhimento, descontinuidade e fragmentação de membrana e presença de protusões) nos parasitos tratados e não tratados.

4.5.7 Marcação de vacúolos autofágicos

Parasitos na forma tripomastigota (10^7 parasitos/poço) foram incubados em placa de 24 poços, tratados com o composto 3 na concentração de IC_{50} (2,1 μ M) e

mantidos em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, foi adicionado o marcador de fluorescência monodansilcadaverina (MDC) (Sigma) (revisado por DESOTI *et al.*, 2012; revisado por FERNANDES *et al.*, 2012) na concentração de 0,05 mM por quinze minutos e os parasitos foram lavados com PBS duas vezes. A marcação com MDC foi analisada através do microscópio Confocal FV1000 (Olympus). Como controle positivo foi utilizado o fármaco rapamicina (Sigma) na concentração de 0,1 µg/mL.

4.5.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Células (10⁶ células/poço) da linhagem J774 (macrófagos tumorais isolados de camundongos BALB/c) foram incubadas em placas de 24 poços e infectadas com tripomastigotas (2 x 10⁵ parasitos/poço) por 3 horas. Após este período os poços foram lavados com salina e foi adicionado o composto 3 na concentração de 10 µM e a placa foi mantida em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo foram utilizadas células estimuladas com IFN-γ (5 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) (500 ng/mL) (Sigma), enquanto que a ausência destes estímulos e do tratamento representou o controle negativo. A dosagem de óxido nítrico foi realizada através do método de Griess (DING *et al.*, 1988) após 24 horas da adição do composto 3. No grupo estimulado (controle positivo), a adição de IFN-γ e de LPS ocorreu após as três primeiras horas de incubação, ou seja, no mesmo momento em que o composto 3 foi adicionado aos poços do grupo tratado.

4.5.9 Marcação de células apoptóticas e necróticas

Parasitos na forma tripomastigota (10⁷) foram tratados ou não com composto 3 na concentração de IC₅₀ (2,1 µM) e mantidos durante 24 e 36 horas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Os parasitos foram marcados com iodeto de propídio (PI) para avaliar necrose e com anexina V para avaliar apoptose nas

concentrações de 10% e 1%, respectivamente, por quinze minutos na ausência de luz, utilizando o Kit Anexina V-FITC (Biosource, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos e analisados pela técnica de citometria de fluxo, utilizando o citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA), com o software Cell Quest. Cerca de 10.000 eventos foram analisados.

4.6 ENSAIO *IN VIVO*

4.6.1 Infecção e tratamento

Camundongos da linhagem BALB/c (6 animais por grupo) foram infectados por via intraperitoneal com 10^4 tripomastigotas sanguícola da cepa Y por animal. Os camundongos foram tratados, por via oral, com os quatro compostos na dose de 25 mmol/kg/dia por cinco dias consecutivos, a partir do 5º dia de infecção. Como controle positivo foi utilizado o benzonidazol na dose de 384 mmol/kg/dia (100 mg/kg/dia) e como controle negativo foi utilizada a solução salina. Os compostos e o benzonidazol foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a 10% em solução salina. O grupo controle foi tratado com veículo (10% de DMSO em salina).

A atividade dose-resposta do composto 3 também foi avaliada. Os protocolos de infecção e tratamento foram semelhantes ao anterior e as doses utilizadas para este experimento foram 25, 50 e 75 mmol/kg/dia deste composto.

4.6.2 Avaliação da parasitemia e mortalidade

Cerca de 5 μ L de sangue foram coletados da cauda dos camundongos infectados e dispostos em lâmina, coberta com lamínula de 22 x 22 mm, obtendo-se uma camada única e homogênea de hemácias. As lâminas foram levadas diretamente ao microscópio óptico para a realização da contagem de 50 campos microscópicos aleatórios em objetiva de 40x. O número de parasitos encontrados foi

dividido pelo número de campos microscópicos observados e multiplicado por um fator de correção de 7. O resultado foi apresentado em gráfico com 10^5 tripomastigotas/mL (Método de BRENER baseado no de PIZZI – BRENER, 1962; BRENER, 2000). A parasitemia foi acompanhada nos dias 5, 8, 10 e 12 pós-infecção.

A mortalidade dos animais foi avaliada através de acompanhamento diário por 30 dias.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Em relação aos experimentos *in vitro*, a análise estatística dos dados dos experimentos de citotoxicidade celular, de infecção de macrófagos e de dosagem de NO foi realizada através do programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software), utilizando o teste One-Way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, ou o teste *t* pareado, sendo considerado valores estatisticamente significante aqueles com valores $p < 0,05$.

Já a análise estatística dos dados da microscopia eletrônica de varredura foi realizada através do programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software), utilizando o teste Two-Way ANOVA, sendo considerado valores estatisticamente significante aqueles com valores $p < 0,05$.

Em relação aos experimentos *in vivo*, a análise estatística da parasitemia foi realizada através do programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software), utilizando o teste One-Way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, sendo considerado valores estatisticamente significante aqueles com valores $p < 0,05$. Em relação à mortalidade, a curva de sobrevivência dos animais foi elaborado utilizando o programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA *IN VITRO*

Observamos a inibição *in vitro* do crescimento da forma epimastigota de três dos quatro compostos testados (2, 3 e 4), sendo que o composto 3 apresentou valor de IC₅₀ inferior ao do benzonidazol. Além disso, foi observado que todos os compostos inibiram a viabilidade dos parasitos na forma tripomastigota e a replicação da forma amastigota, inclusive apresentando valores de IC₅₀ inferiores aos valores do fármaco de referência. A partir do valor de LC₅₀ e de IC₅₀ da forma amastigota, foi possível calcular o índice de seletividade (IS), que indica quão seletivo o composto é ao parasito em relação aos macrófagos de camundongos BALB/c utilizados no ensaio de citotoxicidade. A partir destes dados, foi observado que, dentre os compostos testados, o 3 apresentou o maior IS. É possível ainda observar que dentre os quatro compostos em teste, o 1 foi o que apresentou valores de IC₅₀ e LC₅₀ mais altos. Enquanto o composto 3 apresentou os menores valores de IC₅₀ e o IS mais elevado (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de IC₅₀, LC₅₀ e índice de seletividade dos complexos de rutênio

Composto	IC ₅₀ (µM)			LC ₅₀ (µM)	IS **
	Epimastigota	Tripomastigota	Amastigota	Citotoxicidade Macrófago	Índice de seletividade
1	NA	8,4 ± 1,18	4,2 ± 1,60	>100,0	>24
2	16,6 ± 0,66	2,9 ± 0,29	2,6 ± 0,78	93,1 ± 7,76	36
3	5,7 ± 0,63	2,1 ± 0,65	1,3 ± 0,22	51,4 ± 0,22	40
4	26,7 ± 2,05	5,9 ± 1,06	2,7 ± 0,67	38,3 ± 2,37	14
Benzonidazol	10,7 ± 1,62	11,4 ± 1,09	14,0 ± 0,39	>100,0	>7

*NA = Não ativo ** em relação à atividade na forma amastigota

O cálculo de IC₅₀ para a forma amastigota foi realizado a partir do ensaio de infecção de macrófagos e o parâmetro utilizado no cálculo foi a porcentagem de inibição de amastigota em relação ao controle negativo. Graficamente, os dois

parâmetros avaliados (porcentagem de redução de células infectadas em relação ao controle negativo e porcentagem de inibição de amastigota em relação ao controle negativo) (Figura 5 A e B) foram representados utilizando a concentração de 5 μ M, concentração esta que não induziu toxicidade em macrófagos peritoneais tratados com os composto 1, 2 e 3 nas mesmas condições experimentais do ensaio de infecção de macrófagos (Figura 6). Em relação à porcentagem de redução de células infectadas (Figura 5 A), observa-se que os quatro compostos em teste na concentração de 5 μ M reduziram o número de células infectadas, inclusive de forma estatisticamente significativa em relação ao benzonidazol. O benzonidazol, por apresentar elevados valores de IC_{50} , não reduziu o número de células infectadas nesta concentração. O composto 1 foi aquele que apresentou menor atividade tripanocida dentre os quatro compostos testados. Os compostos 3 e 4 apresentaram porcentagens de redução no número de amastigota estatisticamente significativas em relação ao composto 1, apresentando porcentagens de inibição em relação ao controle negativo de 64% e 65%, respectivamente. Já em relação à porcentagem de inibição de amastigota, também houve redução pelo tratamento com todos os quatro compostos testados, com valores estatisticamente significativos em relação ao controle positivo. O composto 3 foi aquele que reduziu a porcentagem de amastigotas em relação ao controle negativo de forma mais acentuada (74%).

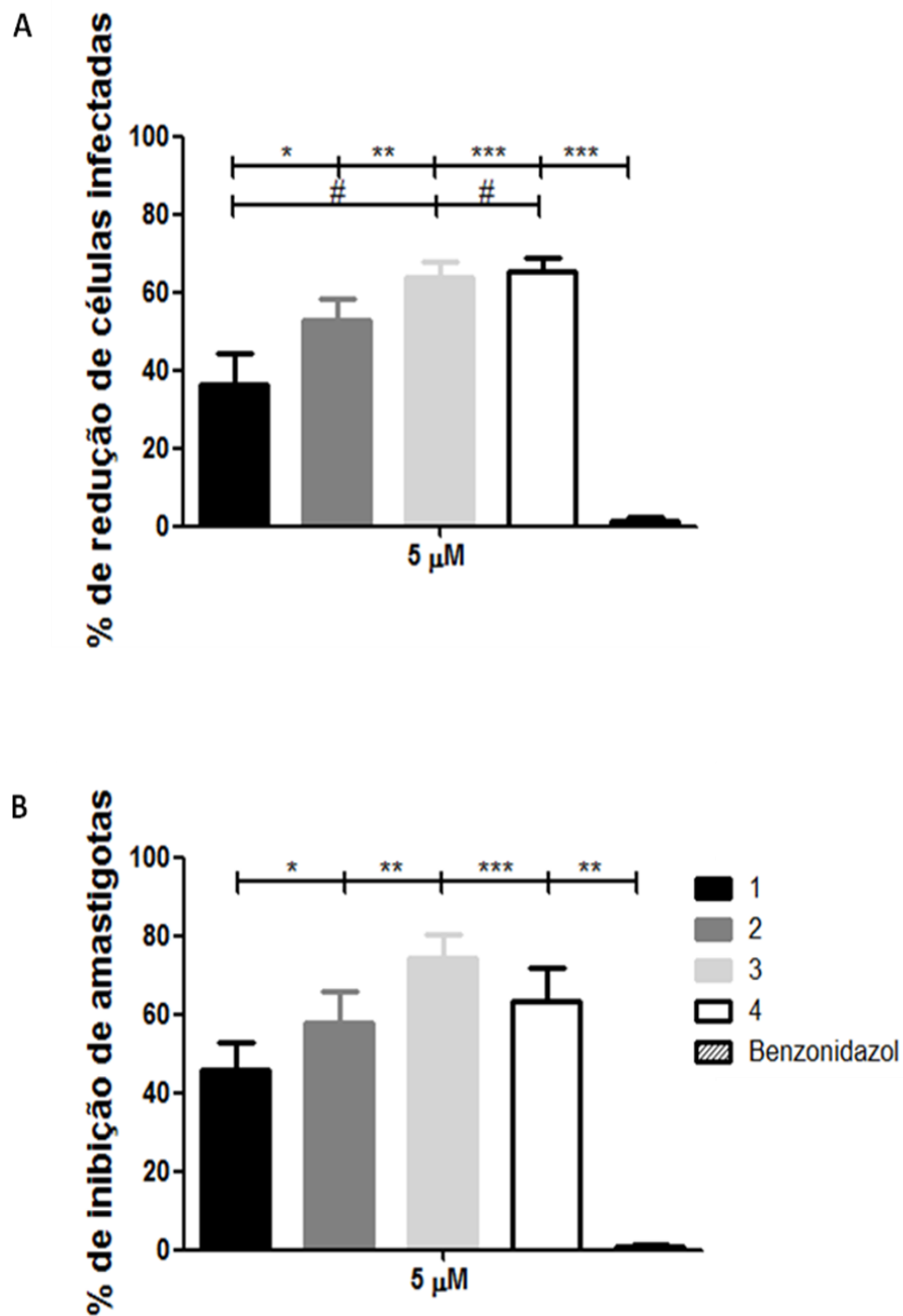


Figura 5 – Efeito dos compostos na infecção de macrófagos tratados por seis horas. Os gráficos A e B representam a porcentagem de redução do número de células infectadas em relação ao controle negativo e a porcentagem do número de amastigotas por 100 células contadas em relação ao controle negativo, respectivamente. O controle negativo que corresponde o 0% do gráfico. Os quatro compostos e o benzonidazol foram testados na concentração de 5 μ M. * - representa a análise estatística em relação ao benzonidazol (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$). # - representa a análise estatística do composto 1 em relação aos demais. O número de * e # é correspondente em relação ao valor p .

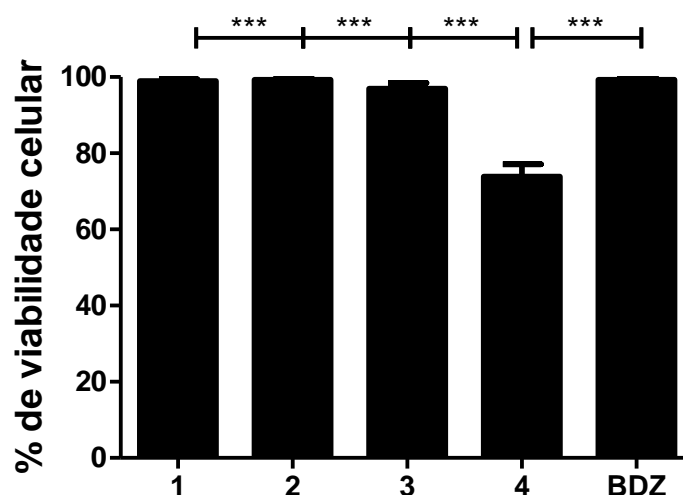


Figura 6 – Viabilidade de macrófagos peritoneais tratados por seis horas. O gráfico representa a porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle negativo. Os quatro compostos e o benzimidazol (BDZ) foram testados na concentração de 5 μM . *** representa a análise estatística em relação ao composto 4 ($p < 0,0001$).

5.1.1 Avaliação da inibição enzimática

A partir do ensaio de inibição enzimática da cruzaína é possível observar que os compostos 1 e 2 foram os que apresentaram os menores valores de IC_{50} , apresentando uma porcentagem de inibição na concentração de 25 μM de 30,9% e 0%, respectivamente. Já os compostos 3 e 4 apresentaram uma melhor atividade inibitória da ação catalítica da cruzaína, com valores de IC_{50} 14,4 e 0,41 μM , respectivamente. Ambos os compostos apresentaram elevados valores inibitórios na concentração de 25 μM , sendo eles 67,3% e 98,2%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Determinação da atividade inibitória dos compostos na atividade catalítica da cruzaína

Composto	% de inibição a 25 μM ^a	IC_{50} (μM)
1	30,9	30,2 \pm 7,3
2	0,0	>100,0
3	67,3	14,4 \pm 6,6
4	98,2	0,41 \pm 0,13
E64-c	100,0	0,001 \pm 0,0008

^a Compostos foram testados na concentração de 25 μM , em triplicatas

5.2 AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA *IN VIVO*

Os quatro compostos foram testados *in vivo* utilizando a dose de 25 mmol/kg/dia com objetivo de avaliar o composto que apresentava melhor redução de parasitemia e aumento de sobrevivência. Em relação à parasitemia, observamos que o composto 1 não foi capaz de reduzir o número de parasitos em relação ao controle negativo de forma significativa nos dias 5, 8, 10 e 12 pós-infecção. Já o composto 2 reduziu significativamente ($p < 0,05$) a parasitemia em relação ao controle negativo apenas no dia 10 pós-infecção. O composto 3 reduziu a parasitemia de forma estatisticamente significante em relação ao controle nos dias 10 ($p < 0,01$) e 12 ($p < 0,001$). O composto 4 também reduziu significativamente a parasitemia nos dias 10 ($p < 0,05$) e 12 ($p < 0,001$) (Figura 7). O benzonidazol, na dose de 384 mmol/kg/dia, reduziu significativamente em todos os dias avaliados (Figura 7).

Em relação à mortalidade, o tratamento com os compostos 1 e 3 causou um aumento de sobrevida dos camundongos quando comparados ao grupo do controle negativo. Até o dia 30 pós-infecção, apenas um animal (16,7%) do grupo 3 permaneceu vivo, enquanto que o último óbito do grupo 1 foi observado no dia 26 pós-infecção. Os animais tratados com o benzonidazol apresentaram uma taxa de sobrevida de 100% (Figura 8).

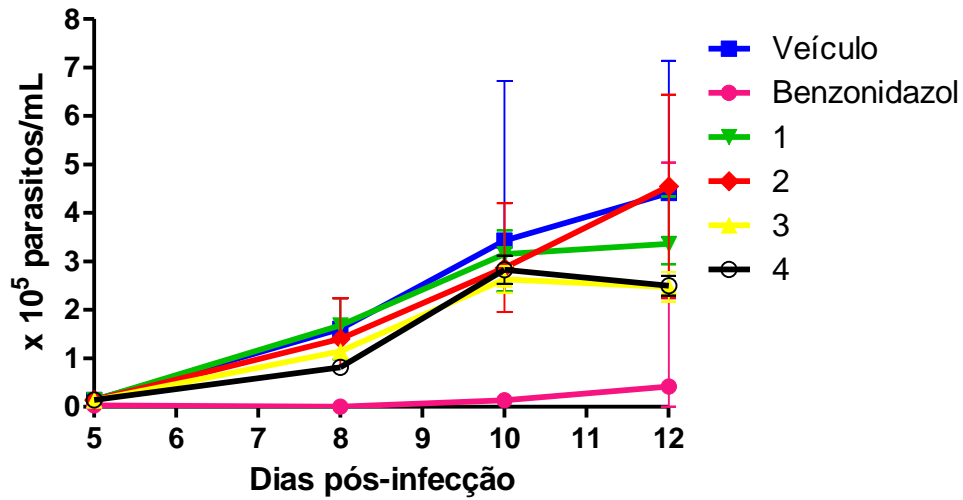


Figura 7 – Parasitemia de animais infectados com *T. cruzi* tratados ou não com os complexos de rutênio (1, 2, 3 e 4). Os camundongos foram tratados por via oral com a dose de 25 mmol/kg/dia por 5 dias consecutivos e a parasitemia foi realizada nos dias 5, 8, 10 e 12 pós- infecção. Foi utilizado como controle positivo o fármaco de referência, benzonidazol, com a dose de 384 mmol/kg/dia (100 mg/kg/dia) e, como controle negativo, apenas o veículo. Os dados representam a mediana de 6 animais/grupo.

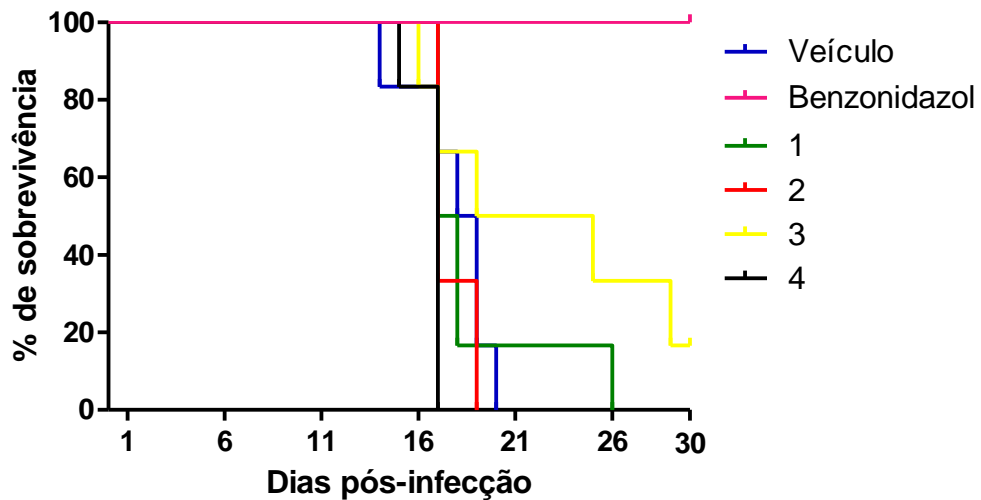


Figura 8 - Curva de sobrevivência. A taxa da mortalidade dos grupos foi observada até o dia 30 pós-infecção. Foi utilizado como controle positivo o fármaco de referência, benzonidazol, com a dose de 384 mmol/kg/dia (100 mg/kg/dia) e, como controle negativo, apenas o veículo. Os dados representam o % de animais vivos (6 animais/grupo) em cada ponto analisado.

5.3 AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA – COMPOSTO 3

5.3.1 Avaliação *in vivo*

A partir dos dados *in vitro*, observou-se que o composto 3 apresentou melhores valores nos parâmetros avaliados. Em seguida, foi realizado um novo experimento *in vivo* utilizando o mesmo protocolo de infecção e tratamento e a mesma forma de avaliação da parasitemia e mortalidade. No entanto, apenas o composto 3 foi testado, com três doses diferentes, 25, 50 e 75 mmol/kg/dia, a fim de avaliar qual seria a dose ideal para o tratamento dos camundongos chagásicos.

É possível observar uma curva dose-resposta em relação à parasitemia. Foi observado no pico da parasitemia (dia 10 pós-infecção) porcentagem de redução da parasitemia dos camundongos tratados com a dose de 75 mmol/kg/dia de 46% em relação ao controle negativo. Já a porcentagem do grupo tratado com 50 mmol/kg/dia foi 38% e de 25% em relação ao grupo tratado com a dose de 25 mmol/kg/dia (Figura 9). O grupo tratado com o benzonidazol zerou a parasitemia.

Em relação à curva de mortalidade, observa-se que o grupo tratado com o benzonidazol apresentou 100% de sobrevivência. O grupo tratado com a maior dose apresentou uma taxa de sobrevivência de 50%, enquanto que tanto o grupo de controle negativo e o grupo tratado com a menor dose apresentaram taxa de sobrevivência de 16,7%. Todos os animais do grupo tratados com a dose intermediária vieram a óbito, sendo o primeiro óbito no dia 18 e o último no dia 27 pós-infecção (Figura 10).

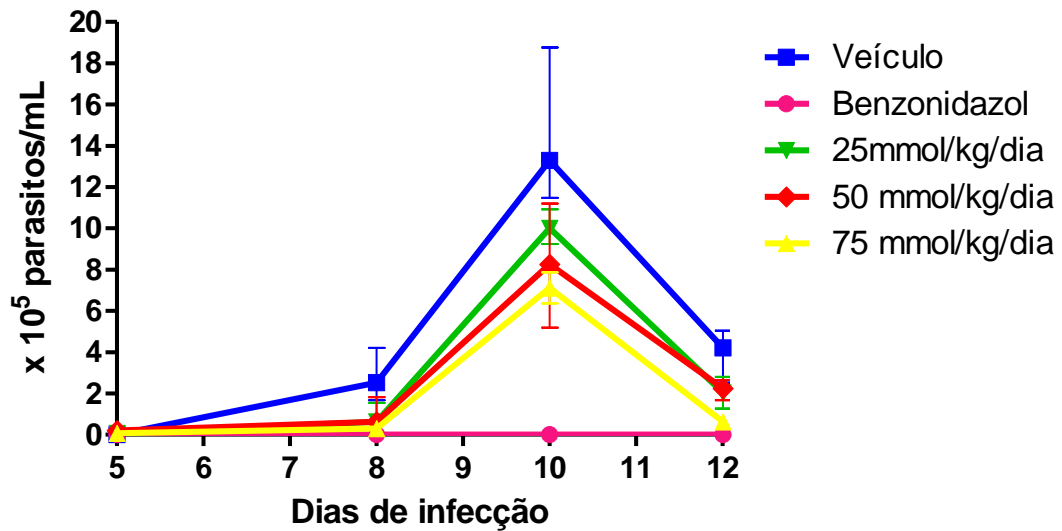


Figura 9 - Avaliação da parasitemia de animais infectados com *T. cruzi* tratados com o composto 3. Os camundongos foram tratados com diferentes doses do composto 3 a partir do 5º dia pós-infecção por 5 dias consecutivos e a parasitemia foi realizada nos dias 5, 8, 10 e 12 pós-infecção. Foi utilizado como controle positivo o fármaco de referência, benzonidazol, na dose de 384 mmol/kg/dia (100 mg/kg/dia), e, como controle negativo, apenas o veículo. Os dados representam a mediana de 6 animais/grupo.

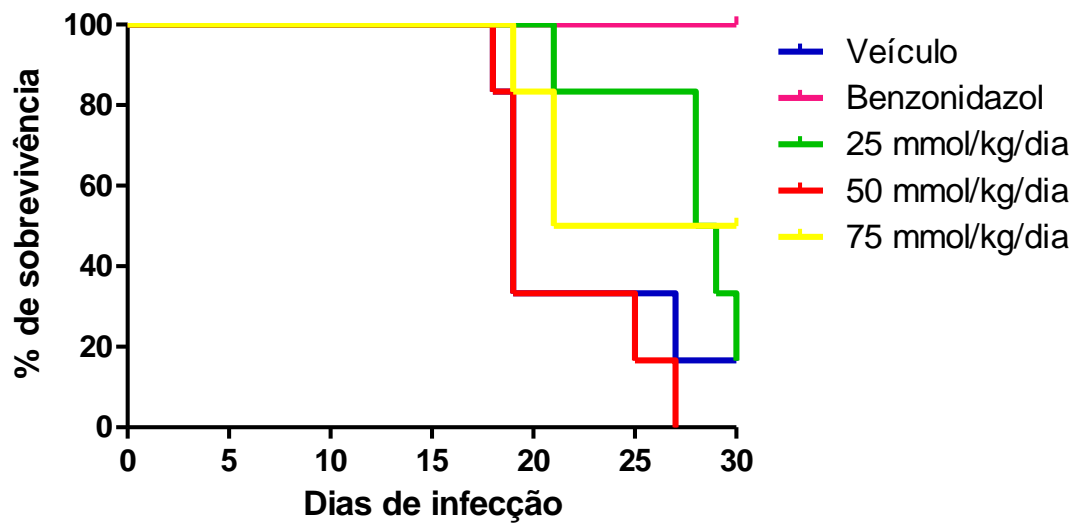


Figura 10 - Curva de sobrevivência. A taxa da mortalidade dos grupos foi observada até o dia 30 pós-infecção. Os dados representam o % de animais vivos (6 animais/grupo) em cada ponto analisado. Foi utilizado como controle positivo o fármaco de referência, benzonidazol, com a dose de 384 mmol/kg/dia (100 mg/kg/dia) e, como controle negativo, apenas o veículo.

5.3.2 Avaliação *in vitro*

5.3.2.1 Infecção de macrófagos

Foi avaliada a atividade tripanocida do composto 3 em macrófagos infectados e tratados por um maior período de incubação. Diferente do experimento de infecção de macrófagos anterior, que o período de tratamento é de seis horas, neste os macrófagos foram tratados por 96 horas. De forma semelhante, é possível observar redução de ambos os parâmetros avaliados (número de células infectadas e número de amastigotas por 100 células) de forma estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. Ambos os grupos, tratado e controle positivo, foram tratados com a concentração de 1 μM . O benzonidazol, nesta concentração, não é capaz de induzir redução de ambos os parâmetros (Figura 11 A e B).

Em relação à toxicidade celular, nesta mesma concentração, não foi observado efeito citotóxico, indicando que o efeito tripanocida foi seletivo, sem qualquer efeito tóxico ao macrófago de mamífero (Figura 12).

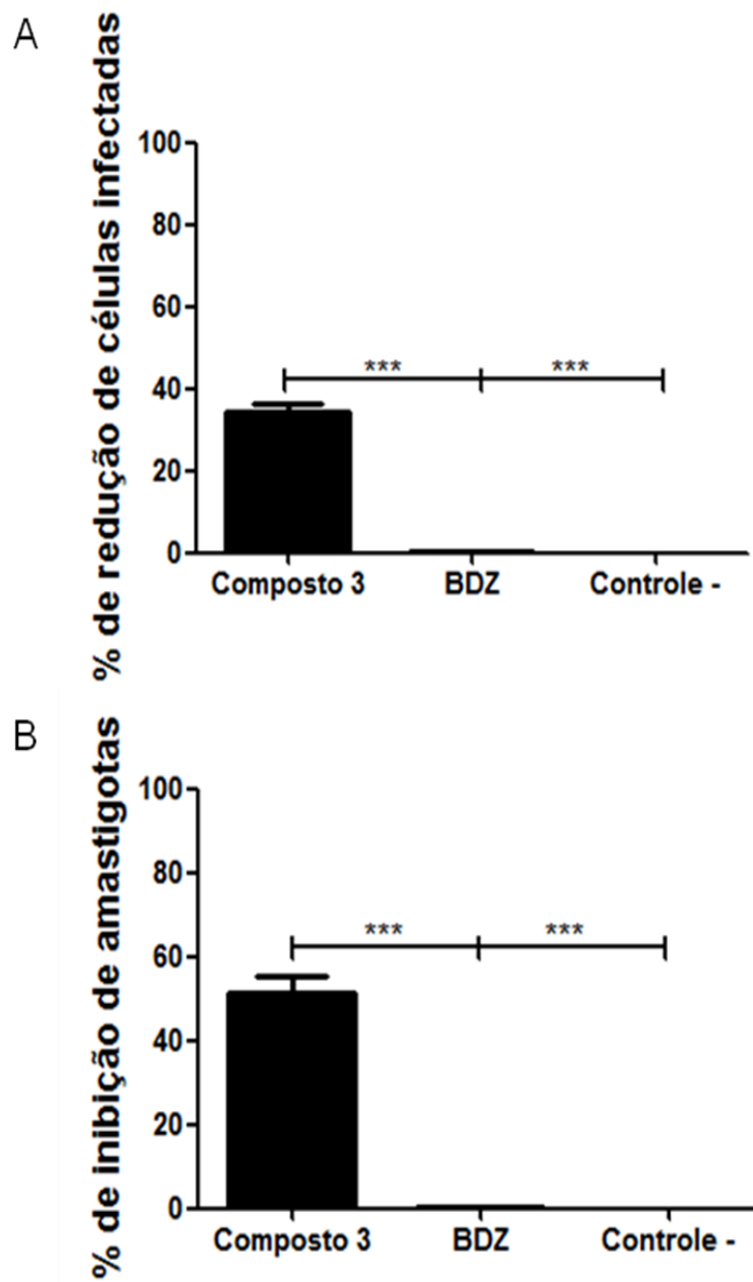


Figura 11 - Infecção de macrófagos utilizando o tratamento com 96 horas de duração. Os gráficos A e B representam a porcentagem de redução de células infectadas e a porcentagem de inibição de amastigotas, respectivamente. O cálculo da porcentagem foi feito em relação ao controle negativo, que corresponde o 0% do gráfico. O composto 3 e o benzonidazol (BDZ) foram testados na concentração de 1 μ M. *** representa a análise estatística em relação ao composto 3 (** $p < 0,0001$).

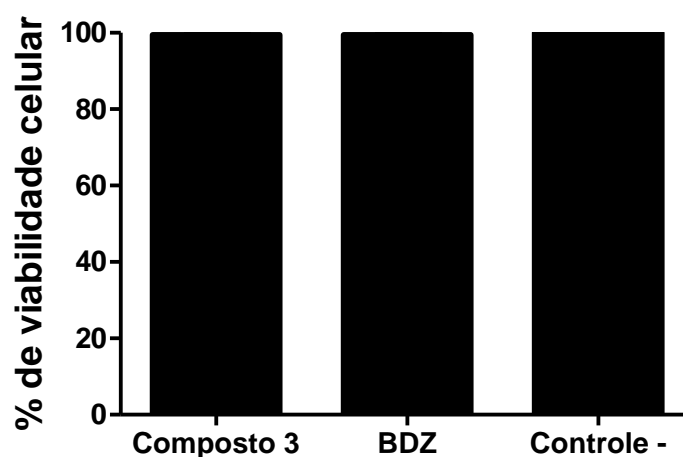


Figura 12 - Viabilidade de macrófagos peritoneais tratados por 96 horas. O gráfico representa a porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle negativo, que corresponde o 100% do gráfico. As células do grupo tratado com o composto 3 e com o benzonidazol (BDZ) foram testados na concentração de 1 μ M.

5.3.2.2 Avaliações de alterações ultraestruturais

Os parasitos na forma tripomastigota tratados com o composto 3 foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e quantificados quanto à presença de alterações ultraestruturais, dentre elas o encolhimento, a descontinuidade e a fragmentação de membrana e a protusão (Figura 13).

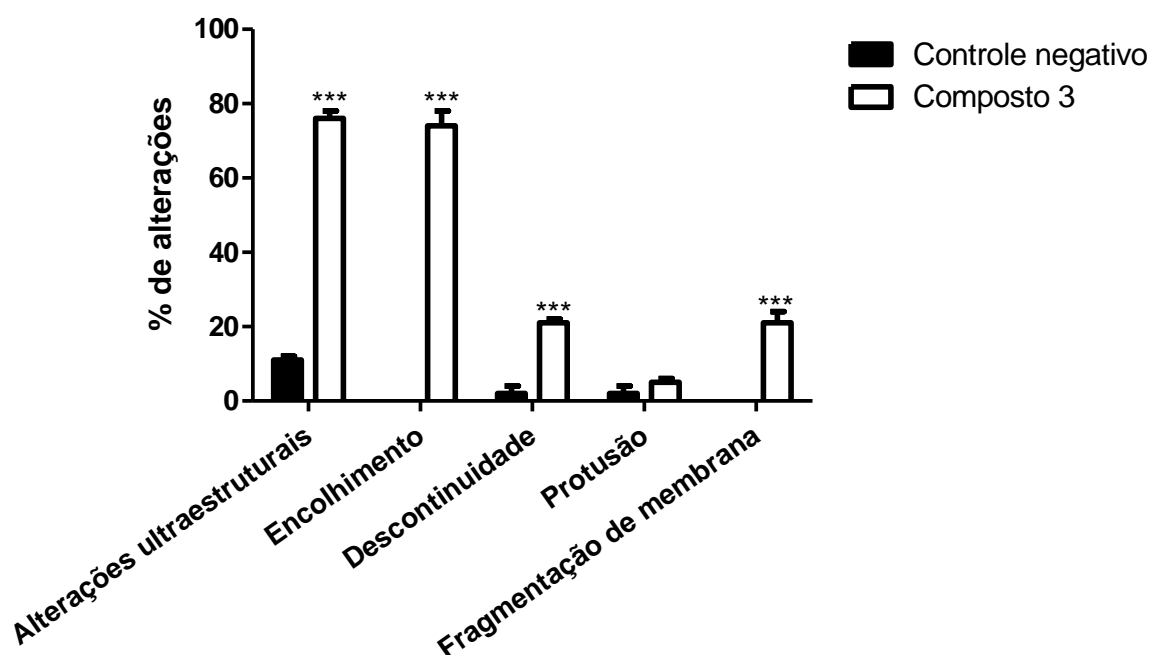


Figura 13 – % de alterações ultraestruturais visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Os parasitos na forma tripomastigota foram tratados por 24 horas com o composto 3 na concentração de IC_{50} (2,1 μM). Foram quantificados 100 parasitos para determinar a presença de encolhimento, descontinuidade de membrana, protusão e fragmentação de membrana. O controle negativo representa os parasitos sem tratamento. *** $p < 0,001$.

As alterações ultraestruturais estão representadas na figura 14. As imagens A e B representam o controle negativo, enquanto que as imagens C e D representam os parasitos tratados com o composto 3 na concentração de IC_{50} (2,1 μM). As 4 imagens estão no aumento de 9000 vezes, facilitando assim a comparação entre os grupos. Observa-se nas imagens C e D a presença das alterações que foram consideradas estatisticamente significativas em relação ao controle, sendo elas, encolhimento, descontinuidade e fragmentação da membrana (Figura 14).

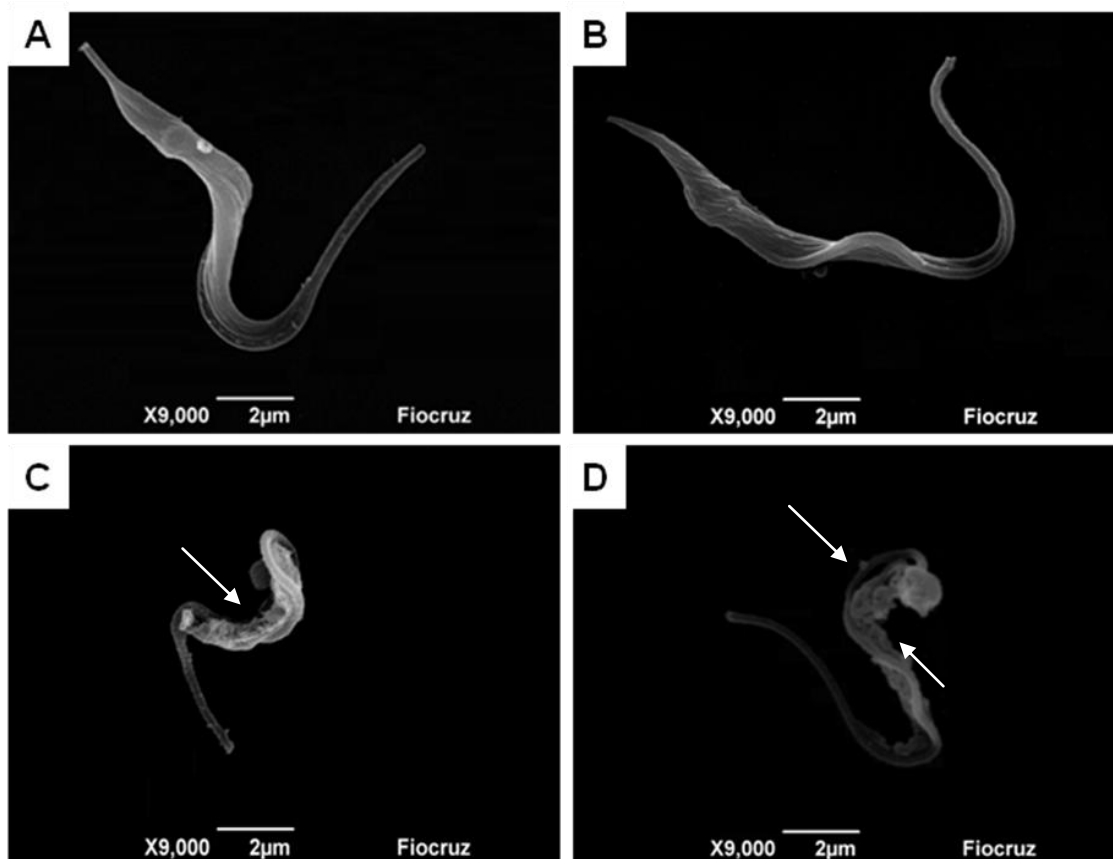


Figura 14 – Alterações ultraestruturais observadas em tripomastigotas por microscopia eletrônica de varredura. Os parasitos foram tratados ou não com o composto 3 na concentração de IC_{50} ($2,1 \mu M$) por 24 horas. A e B representam o controle sem tratamento e C e D representam os parasitos tratados. As setas brancas apontam as principais alterações observadas. Na imagem C é possível verificar o encolhimento do parasito quando comparado ao controle sem tratamento (Imagens A e B) e a fragmentação da membrana. Na imagem D é possível verificar a presença de descontinuidade e fragmentação de membrana.

Os parasitos na forma tripomastigota tratados com o composto 3 também foram visualizados por microscopia eletrônica de transmissão e foi possível observar a formação de estruturas concêntricas na mitocôndria (setas, Figuras 15C e D), além de regiões de abertura de retículo endoplasmático. Foram observados também, por microscopia eletrônica de transmissão, macrófagos infectados com os parasitos e tratados com o composto 3. Foi observada a presença de vacúolos nos parasitos do grupo tratado quando comparado ao controle (setas, Figuras 16C e D).

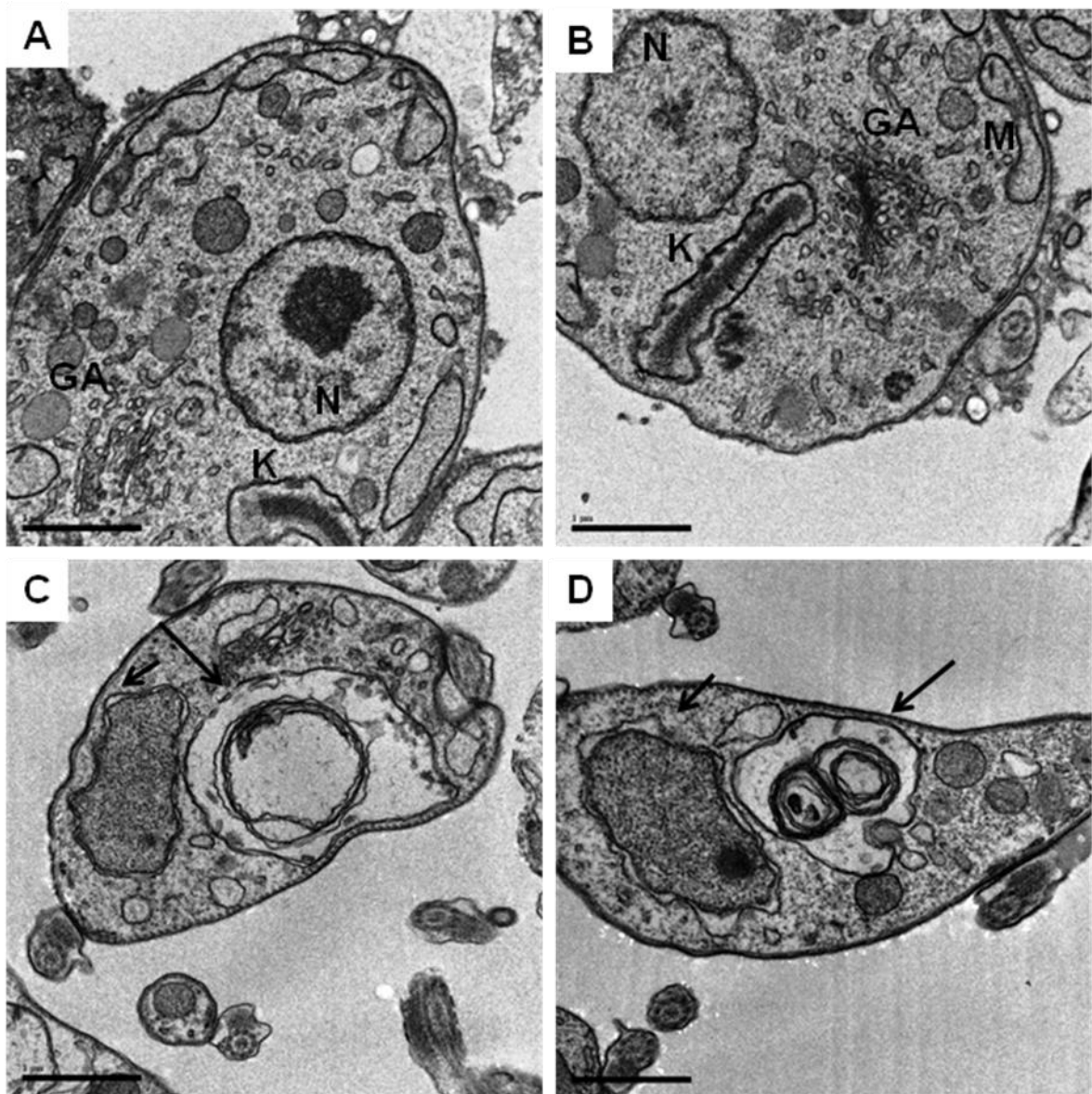


Figura 15 – Alterações ultraestruturais observadas em tripomastigotas por microscopia eletrônica de transmissão. Os parasitos foram tratados ou não com o composto 3 na concentração de IC_{50} ($2,1 \mu M$) por 24 horas. A e B representam o controle sem tratamento e C e D representam os parasitos tratados. As setas pretas representam as principais alterações observadas nos parasitos tratados (estruturas concêntricas na mitocôndria e regiões de abertura de retículo endoplasmático). GA – complexo de Golgi, K – cinetoplasto, N – núcleo e M – mitocôndria. Barras – $1 \mu m$.

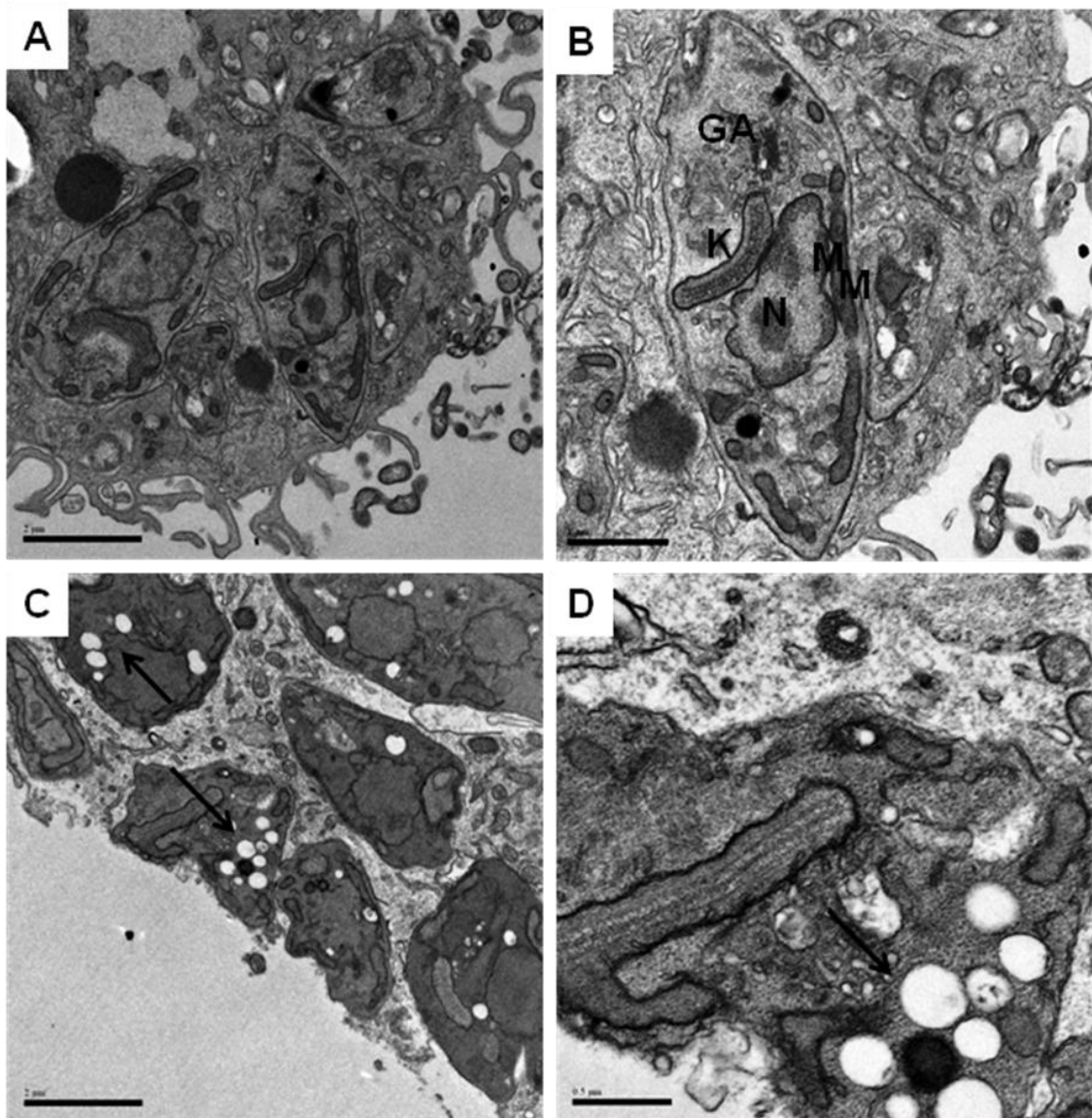


Figura 16 – Alterações ultraestruturais observadas por microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados com tripomastigotas tratados ou não com o composto 3 por 6 horas. A e B representam o grupo controle e C e D representam o grupo tratado. As setas pretas indicam a presença de vacuolização citoplasmática. As figuras B e D são visualizações do mesmo campo das figuras A e C, respectivamente, com maior aumento. Barras A e C – 2 μm , B - 1 μm e D – 0,5 μm .

5.3.2.3 Marcação de vacúolos autofágicos

Observamos a fluorescência positiva para o MDC, um marcador de vacúolos autofágicos, nos parasitos tratados com o composto 3 na concentração de 2,1 μM . O controle negativo não apresentou marcação fluorescente e o controle positivo (rapamicina) apresentou marcação positiva (Figura 17).

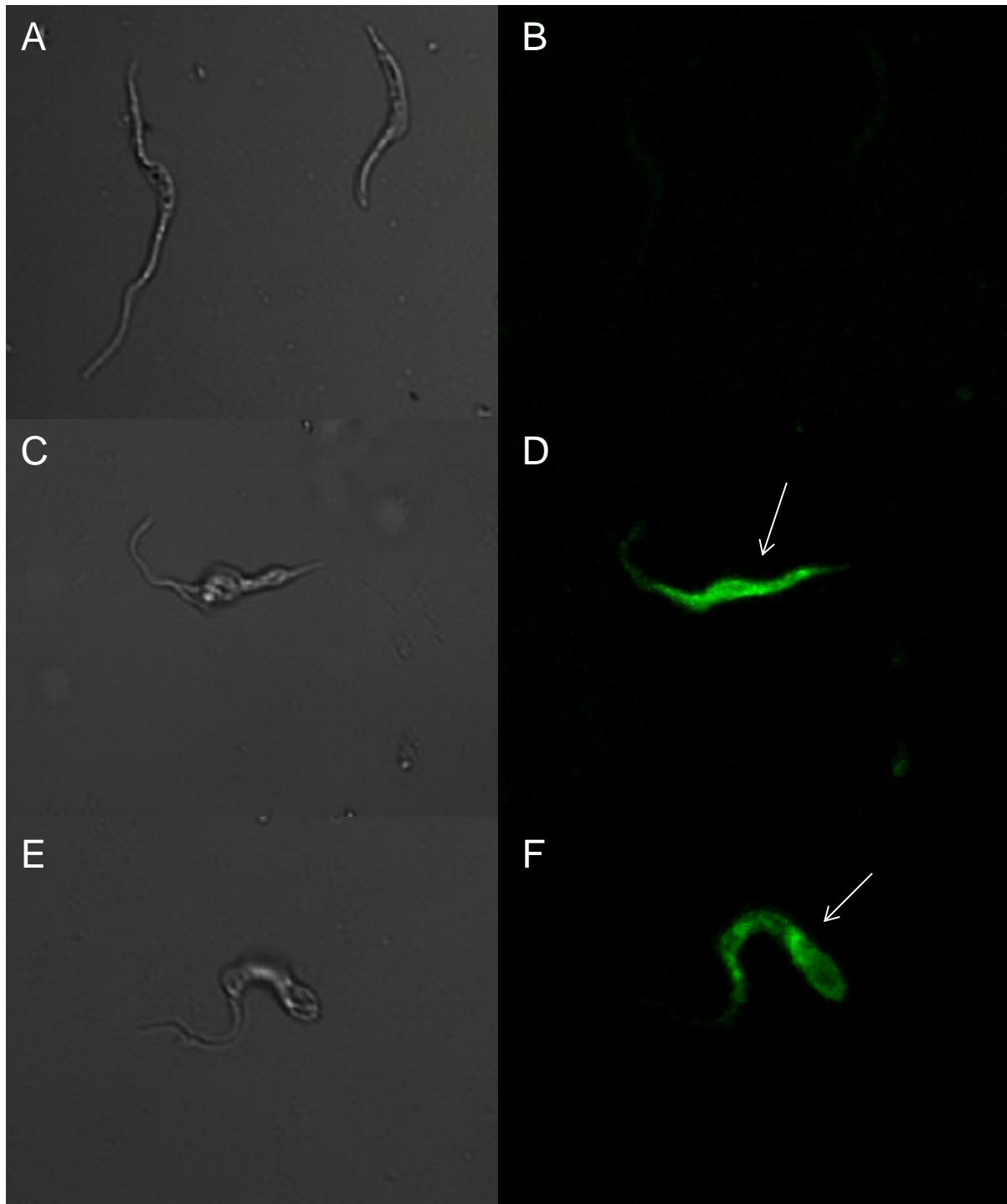


Figura 17 - Marcação com MDC para determinação de autofagia no *Trypanosoma cruzi* após tratamento com o composto 3. Os parasitos foram tratados ou não com o composto 3 por 24 horas e marcados com MDC. A coluna cinza representa as figuras com DIC e a coluna preta com fluorescência. (A,B) Imagens representativas do controle negativo; (C,D) Imagens representativas do controle positivo – rapamicina 0,1 ug/mL; (E,F) Imagens representativas de parasitos tratados com o composto 3 na concentração de 2,1 µM. As setas brancas indicam as estruturas autofágicas. As imagens estão no aumento de 60x e zoom de 3x.

5.3.2.4 Dosagem de NO

A partir do conhecimento que o composto 3 é doador de NO, foi realizado o ensaio de dosagem de NO no tempo de 24 horas pós-tratamento para observar a concentração indireta de NO, a partir da quantificação de nitrito, presente em macrófagos infectados com tripomastigotas. Observamos uma concentração significativa de NO na cultura tratada com o composto 3 quando comparada ao controle negativo. O controle positivo, estimulado com IFN- γ e LPS, aumentou a produção de NO significativamente em relação aos demais grupos (Figura 18).

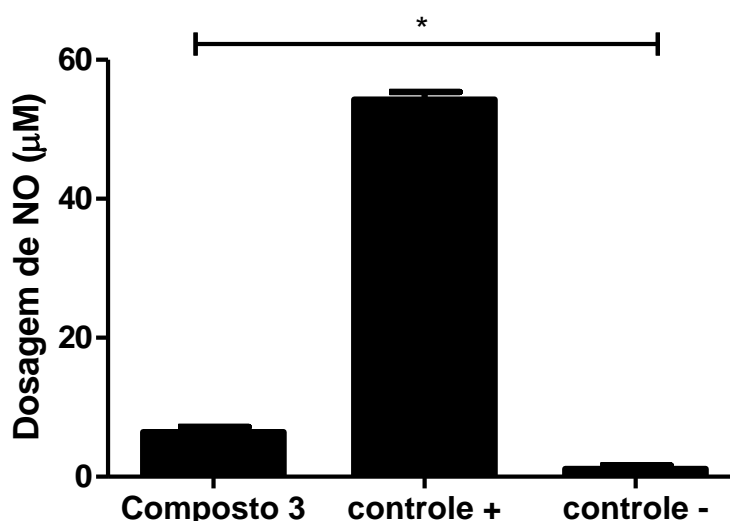


Figura 18 – Dosagem de NO realizada no período 24 horas pós-tratamento. O grupo tratado corresponde a células J774 infectadas com tripomastigotas e tratadas com o composto 3 (10 μ M) por 24 horas. O controle positivo não foi tratado e apenas estimulado com IFN- γ e LPS. O controle negativo não recebeu tratamento nem estímulo. * representa a análise estatística do controle negativo em relação ao grupo tratado com o composto 3 ($p < 0,05$).

5.3.2.5 Marcação de células apoptóticas e necróticas

Com o objetivo de avaliar o tipo de morte celular que o tratamento estava induzindo nos parasitos, os parasitos foram marcados com PI e anexina V e os dados foram adquiridos e analisados por citometria de fluxo. A partir da análise dos

gráficos (figura 19), foi possível observar, em ambos os tempos, 24 e 36 horas, que houve marcação predominante de PI.

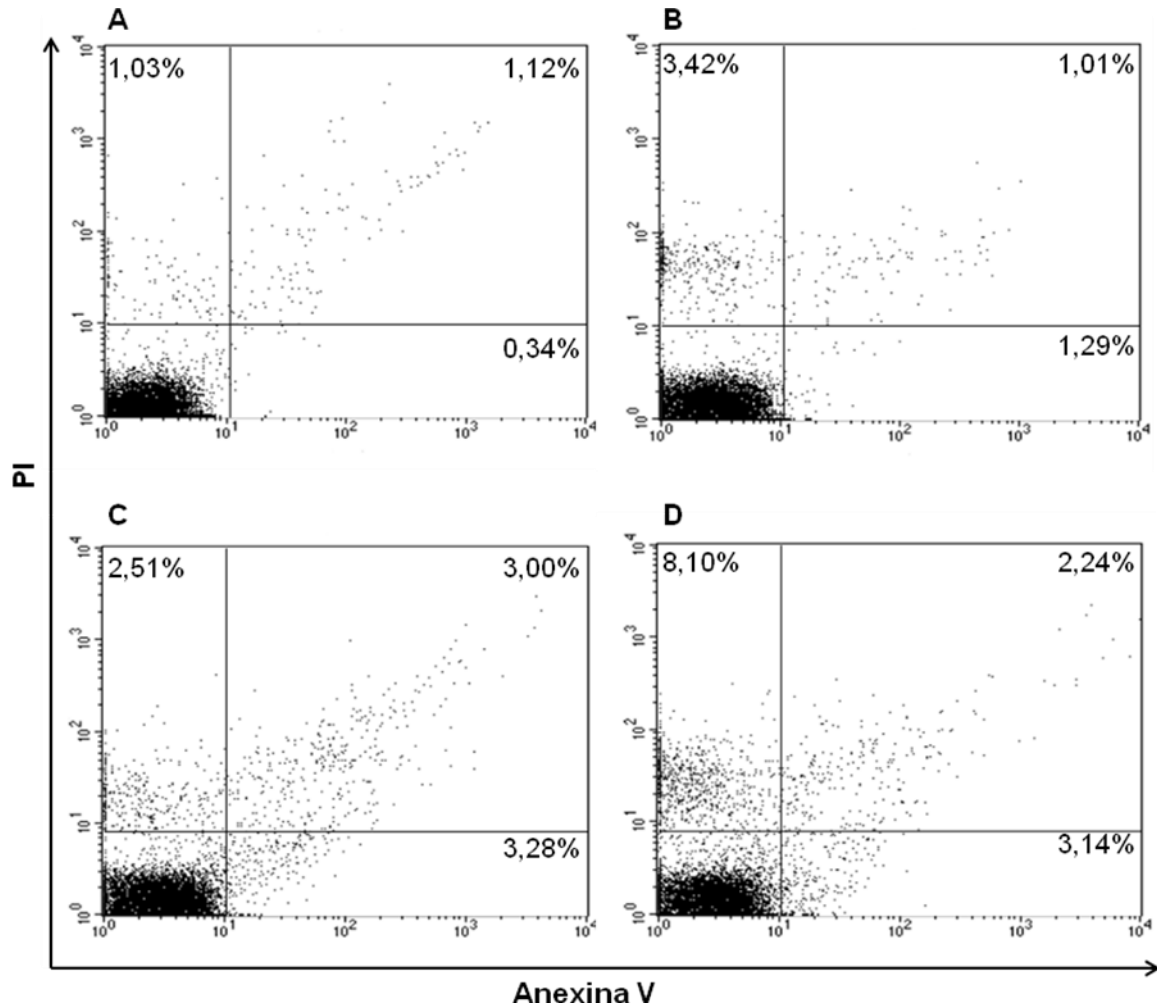


Figura 19 – Marcações com PI e anexina V e análise por citometria de fluxo. Os parasitos na forma tripomastigota foram tratados ou não com o composto 3 (2,1 μ M) durante 24 e 36 horas. A e C representam o controle negativo e B e D representam o grupo tratado. O tratamento por 24 horas está representado em A e B e o tratamento por 36 horas em C e D. É possível verificar marcação predominantemente positiva para PI em ambos os tempos.

6 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços alcançados nas últimas décadas quanto aos controles vetoriais e pela via transfusional adotados por países do Cone Sul, a doença de Chagas ainda representa um sério problema de saúde pública. No Brasil, o benzonidazol é a única opção de tratamento disponibilizado pelo SUS, e como já citado anteriormente, não é um medicamento ideal uma vez que pode desencadear severos efeitos colaterais aos pacientes, apresenta eficácia variada durante o tratamento (a depender da idade do paciente, região geográfica e fase da doença), além da ocorrência de cepas do *T. cruzi* resistentes à medicação. Assim, torna-se urgente a identificação de novas moléculas com atividade tripanocida.

Tem sido descrito na literatura o uso de diferentes complexos de rutênio na terapia da doença de Chagas (GUEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). Neste contexto, os quatro nitro/nitrosilo complexos de rutênio foram testados *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar o potencial anti-*T. cruzi* destes compostos.

Uma análise comparativa da inibição da replicação de epimastigotas e da viabilidade de tripomastigotas de cepa Y tratadas com diferentes complexos de rutênio descritos na literatura demonstra que os compostos testados neste trabalho apresentam melhor atividade anti-*T. cruzi in vitro*. Parasitos na forma epimastigota tratados com os compostos *cis*-[Ru^{II}(NO⁺)(bpy)₂(imN)](PF₆)₃, *cis*-[Ru^{II}(NO⁺)(bpy)₂(1-miN)](PF₆)₃, *cis*-[Ru^{II}(NO⁺)(bpy)₂(SO₃)]PF₆, e *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄L](BF₄)₃ (L = pz, isn, L-hist, imN, py, ou nic) apresentaram valores de IC₅₀ variando entre 56 e 136 μM. Já em tripomastigotas, os valores de IC₅₀ dos compostos *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ (L = pz, L-hist, imN, SO₃, P(OEt)₃, ou ina) e *cis*-[Ru^{II}(NO⁺)(bpy)₂(imM)](PF₆)₃ variaram entre 50 a 63 μM (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010; revisto por TFOUNI *et al.*, 2012).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível observar que pequenas alterações na estrutura dos compostos proporcionam atividade citotóxica e tripanocida variadas. Tem sido descrito na literatura que a posição de cada substituinte na molécula tem uma importância fundamental não só nos complexos de rutênio, mas em outros compostos, como por exemplo, os complexos de platina. Foi observado que os mesmos análogos em diferentes posições geométricas (cisplatina

e transplatina) demonstram atividade do isômero *cis* e inatividade do isômero *trans* (COLUCCIA & NATILE, 2007).

Em suma, é possível sugerir que a presença de apenas um grupo nitro na molécula (composto 1) não induz toxicidade celular, entretanto, não é capaz de inibir a proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Já a presença de 2 grupos nitro (composto 2) proporciona uma melhora da atividade tripanocida, incluindo a capacidade de inibir a proliferação de epimastigotas, apesar de também induzir um aumento na citotoxicidade. A limitada ou ausente inibição da atividade da cruzaina por esses compostos sugere que complexos de rutênio que apresentam grupo nitro na sua molécula não agem por esta via enzimática.

A substituição do grupo nitro para o grupo nitrosilo nos compostos 3 e 4 proporcionou um aumento da toxicidade celular, mas melhora significativa da ação tripanocida do composto 3, indicando que a posição do NO nesta molécula na posição *cis* ao cloro e *trans* ao fósforo favorece a atividade anti-*T. cruzi* com uma melhor seletividade. É possível ainda sugerir a importância do grupo nitrosilo como substituinte do complexo de rutênio em relação à atividade inibitória da cruzaina. Estudos envolvendo a identificação de possíveis alvos quimioterápicos de diferentes nitrosilos complexos de rutênio demonstram atividade inibitória da cruzaina e da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SILVA *et al.*, 2010; revisado por TFOUNI *et al.*, 2012).

Atualmente, a combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação tem sido muito utilizada no tratamento de diversas doenças dentre elas a AIDS, tuberculose, hanseníase e a malária, e pode ser também uma alternativa viável para o tratamento da doença de Chagas (COURA, 2009). A terapia combinada com o benzonidazol e/ou nifurtimox permite a utilização de baixas doses destes medicamentos, diminuindo os severos efeitos colaterais decorrentes do tratamento. Além disso, a terapia combinada pode não só aumentar a resposta terapêutica como ajudar a evitar o desenvolvimento da resistência quimioterápica pelo parasito (COURA, 2009), uma vez que podem atuar em diferentes vias metabólicas. Tem sido observado experimentalmente que camundongos tratados com o composto *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ apresentaram uma taxa de cura parasitológica de 30%, entretanto quando este complexo de rutênio doador de NO foi combinado com o benzonidazol esta taxa foi de 80% (GUEDES *et al.*, 2010). A partir dos resultados *in vivo* observados neste trabalho, é possível sugerir que o uso combinado de doses

mais baixas do benzonidazol com composto 3 proporcionem o aumento da sobrevivência dos camundongos tratados, com ausência de parasitos detectados no sangue.

A utilização de maiores doses do composto 3 também pode ser uma solução viável para se obter uma resposta tripanocida mais eficaz durante o tratamento. Entretanto, é preciso observar a presença de possíveis efeitos tóxicos nos camundongos, uma vez que, em geral, quanto menor a potência de um fármaco, e maior a dose necessária, maior a probabilidade de que outros sítios de ação, diferentes do sítio primário, ganhem importância, causando, assim, os efeitos colaterais indesejados (RANG *et al.*, 2008).

É descrito na literatura que o NO é um agente tripanocida (GAZZINELLI *et al.*, 1992) e os mecanismos pelos quais o NO destrói os patógenos invasores incluem a nitrosilação de ácidos nucleicos e a combinação com enzimas que contêm o grupo heme, tais como as enzimas mitocondriais envolvidas na respiração (RANG *et al.*, 2008). O NO pode atuar como radical livre e também pode ser convertido a um ânion altamente reativo (peroxinitrito), além de nitrito e nitrato. O efeito dessas espécies reativas pode proporcionar relevantes lesões celulares, dentre elas a peroxidação lipídica das membranas, modificação oxidativa de proteínas e lesões no DNA (KUMAR *et al.*, 2005). Esse estresse fisiológico pode causar alterações morfológicas importantes (KUMAR *et al.*, 2005). Os estudos de alterações ultraestruturais em tripomastigotas e amastigotas, realizados neste trabalho, demonstram diversas alterações morfológicas como consequência do tratamento com o composto 3. A atrofia celular assim como a hipertrofia e hiperplasia são exemplos de respostas adaptativas celulares às diferentes condições adversas (KUMAR *et al.*, 2005). Assim, é possível sugerir que os parasitos na forma tripomastigota tratados com o composto 3 e visualizados por microscopia eletrônica de varredura apresentaram atrofia celular como resposta adaptativa ao tratamento, uma vez que, foi observado predominantemente tamanho reduzido destes parasitos.

Em diversas situações a atrofia celular se acompanha de um aumento acentuado no número de vacúolos autofágicos (vacúolos intracelulares ligados à membrana que contêm fragmentos de componentes celulares como a mitocôndria, por exemplo, que são destinados a serem digeridos por conteúdos hidrolíticos liberados pelos lisossomos) (KUMAR *et al.*, 2005). A marcação positiva para MDC de tripomastigotas tratadas com o composto 3 sugere a presença desses vacúolos

no parasito. Ademais, em *T. cruzi* a autofagia é caracterizada por um aumento da vacuolização citoplasmática (TSUJIMOTO & SHIMIZU, 2005) e presença de estruturas citoplasmáticas concêntricas (revisado por FERNANDES *et al.*, 2012), alterações estas visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão em parasitos tratados com o composto 3. Assim, uma vez que a autofagia é essencial para a manutenção do equilíbrio metabólico da célula, a partir da reciclagem das estruturas celulares, e que a sua desregulação leva à morte celular (REGGIORI & KLIONSKY, 2002), é possível que o tratamento esteja induzindo morte parasitária por via autofágica.

Uma característica constante da maioria dos tipos de lesão celular é a perda inicial da permeabilidade seletiva da membrana plasmática. A perda desta permeabilidade pode ser causada pelo uso de quimioterápicos e pela formação de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, e pode afetar a mitocôndria, a própria membrana plasmática e outras membranas celulares. Esta lesão resulta em perda de equilíbrio osmótico com influxo de íons e fluidos, assim como perda de enzimas, proteínas e ácidos nucleicos, prejudicando o funcionamento normal da célula (KUMAR *et al.*, 2005). A predominante marcação positiva para PI de tripomastigotas tratadas com o composto 3 demonstram a perda da permeabilidade da membrana plasmática nos parasitos. Além disso, as alterações de membrana, fragmentação e descontinuidade, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura também reforçam esta hipótese. A presença de alterações na mitocôndria, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão nos parasitos tratados com o composto 3, com formação de estruturas concêntricas e inchaço mitocondrial, também podem indicar alteração da permeabilidade da membrana plasmática como efeito do NO doado. Compostos antimicrobianos visando mitocôndrias são alvos valiosos para quimioterapia (KITA *et al.*, 2003) e podem ser particularmente relevantes contra parasitos tripanossomatídeos, em que a própria via glicolítica, além da fosforilação oxidativa, também é dependente da mitocôndria (CLARKSON *et al.*, 1989).

O presente trabalho demonstra a atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *vivo* dos 4 complexos de rutênio testados. Foi observada além da redução da viabilidade de tripomastigotas, uma redução no número de amastigotas e de células infectadas para os 4 compostos. Em relação à forma epimastigota, apenas o composto 1 não foi capaz de inibir a replicação desta forma. Este fato tem sido atribuído à presença de apenas um grupo nitro em sua estrutura. Observou-se que o composto 4

apresentou excelente inibição da atividade enzimática da cruzaina. Entretanto, o baixo índice de seletividade *in vitro* e a morte precoce dos animais tratados com este composto em relação ao controle sugerem a presença de efeitos adversos decorrentes deste tratamento. O composto 3, apesar de apresentar um menor valor de IC₅₀ em relação ao composto 4 neste ensaio de inibição, apresentou uma melhor atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*. Isso pode indicar a possibilidade do composto 3 inibir o crescimento e a viabilidade do *T. cruzi* por um mecanismo que não seja relacionado à cruzaina. Dentre os 4 compostos testados, o composto 3 apresentou melhor atividade tripanocida e uma maior seletividade. Por fim, os resultados deste trabalho sugerem que o NO doado pelo composto 3 é o agente farmacológico responsável pelos diversos efeitos no parasito, desde a alteração na permeabilidade da membrana, o encolhimento de tripomastigotas e alterações mitocondriais, e que o tratamento com este nitrosilo complexo de rutênio está induzindo morte parasitária por via autofágica.

Como perspectivas futuras deste trabalho, é sugerido o uso combinado do composto 3 com o benzonidazol para ensaios *in vivo*. Em modelo de infecção aguda da doença de Chagas, é interessante que além dos parâmetros avaliados, nível de parasitemia e mortalidade, seja também avaliada a cura parasitológica, por métodos moleculares, dos camundongos tratados. É possível ainda sugerir o uso de camundongos imunossuprimidos e mais suscetíveis à infecção aguda como modelo experimental e o uso de cepas do *T. cruzi* mais resistentes ao tratamento com o benzonidazol, como a cepa Colombiana, por exemplo. É extremamente importante que seja avaliada a eficácia do tratamento combinado também na fase crônica da doença de Chagas. Além disso, é interessante que sejam realizados outros ensaios *in vitro* a fim de identificar a via de ação do composto 3 e confirmar a presença de alterações mitocondriais sugeridas neste trabalho. E por fim, este trabalho sugere a utilização do composto 3 como molécula base para a síntese de outros nitrosilos complexos de rutênio visando potencializar a atividade tripanocida destes compostos.

7 CONCLUSÃO

- Os quatro complexos de rutênio testados apresentaram baixa citotoxicidade;
- Apenas o composto 1 não foi capaz de inibir o crescimento da forma epimastigota, enquanto todos os compostos testados inibiram a viabilidade da forma tripomastigota;
- Os complexos de rutênio testados foram capazes de inibir a replicação da forma amastigota em macrófagos peritoneais infectados pelo *T. cruzi*, apresentando redução do número de células infectadas e de amastigotas por célula;
- Apenas o composto 2 não foi capaz de inibir a atividade enzimática da cruzaina;
- O modelo experimental *in vivo* demonstra que os compostos 1 e 2 apresentaram baixa resposta tripanocida, enquanto os compostos 3 e 4 conseguiram reduzir os níveis de parasitemia de forma mais acentuada, apesar de apenas o composto 3 ter aumentado a taxa de sobrevivência dos camundongos;
- Foi observada a presença de alterações ultraestruturais, como encolhimento do parasito, fragmentação e descontinuidade de membrana, além de presença de vacúolos citoplasmáticos e estruturas concêntricas decorrentes do tratamento *in vitro* com composto 3;
- É possível sugerir que o NO doado pelo composto 3 seja o agente tripanocida responsável pelas alterações celulares e pela morte parasitária por via autofágica.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **J Infect Dis.** v. 201, n. 9, p.1308-15, 2010.
- AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9.000-years record of Chagas' disease. **Proc Nat Acad Sci USA.** v. 101, p. 2034-2039, 2004.
- BOCEDI, A. *et al.* Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 315, p. 710–718, 2004.
- BONAVIDA, B. *et al.* Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. **Drug Resist Updat.** v. 9, p. 157–173, 2006.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 4, p. 389-96, 1962.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan 2ª Edição. Rio de Janeiro, 2000. 431 p.
- BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Curr Opin Infect Dis.** v. 23, n. 6, p. 609-16, 2010.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** v. 2, p. 236-242, 2012.
- CAMPETELLA, O.; MARTINEZ, J.; CAZZULO, J. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 55, p. 145-149, 1990.
- CARDILLO, F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: the role of NK cell. **Infect Immun.** v. 64, p. 128–134, 1996.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acessado em 20 de janeiro de 2013.

CHAGAS, C. - Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Tripanomíase Americana. Forma aguda da moléstia. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 8, p. 37-65, 1916.

CLARKSON, A. B. *et al.* Trypanocidal CoQ analogues: their effect on other mitochondrial systems. **Comp Biochem Physiol B.** v. 94, p. 245–251, 1989.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature.** v. 465, suppl. S6—S7, 2010a.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature.** v. 465, suppl. S12—S15, 2010b.

COLUCCIA, M.; NATILE, G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem.** v. 7, n. 1, p. 111-23, 2007.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Cienc. Cult.** v. 55, n. 1, p. 30-33, 2003.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 102, suppl. 1, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.104, suppl. 1, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature.** v. 465, n. 7301, suppl. S6—S7, 2010.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.** v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DESOTI, V. C. *et al.* Trypanocidal Action of (-)-Elatol Involves an Oxidative Stress Triggered by Mitochondria Dysfunction. **Mar Drugs.** v. 10, n. 8, p. 1631–1646, 2012.

DIAS DE TORANZO E. G. D. *et al.* Interaction of benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia.** v. 44, n. 10, p. 880-1, 1988.

DOCAMPO, R.; STOPANI, A. O. M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochem. and Biophys.** v. 197, p. 317-321, 1979.

DOS REIS, F. *et al.* The substrate specificity of cruzipain 2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 259, p. 215-220, 2006.

ENGEL, J. C. *et al.* Cysteine protease inhibitors cure experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** v. 188, p. 725–734, 1998.

FERNANDES, M. C. *et al.* A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology.** v. 139, p. 26–36, 2012.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today.** v. 7, n. 9, p. 240-4, 1991.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immun.** v. 22, p. 2501–2506, 1992.

GLOBAL FORUM FOR HEALTH RESEARCH. The 10/90 Report on Health Research 2001–2002. Global Forum for Health Research, Geneva, Switzerland, 2002.

GUEDES, P. M. *et al.* Nitric oxide donor trans-[RuCl([¹⁵aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **Br J Pharmacol.** v.160, p. 270–282, 2010.

HOLSCHER, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity.** v. 66, p. 1208-1215, 1998.

KITA, K.; NIHEI, C.; TOMITSUKA, E. Parasite mitochondria as drug target: diversity and dynamic changes during the life cycle. **Curr Med Chem.** v. 10, p. 2535–2548, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. *Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças.* 7 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2005.

MARTINS, G. A. *et al.* Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immun Lett.** v. 63, p. 113–120, 1998.

MCKERROW, J. *et al.* Proteases in parasitic diseases. **Annual Review Pathology Mechanisms Disease.** v. 1, p. 497-536, 2006.

MEIRELLES, M. *et al.* Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. **Mol Biochem Parasitol.** v. 52, p. 175- 184, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspectos Epidemiológicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454. Acessado em 19 de novembro de 2012.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 104, Suppl. I, p. 17-30, 2009.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Rev Pharmacol Toxicol.** v. 43, p. 97–123, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível na Internet via: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acessado em: 1 de dezembro de 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Neglected tropical diseases. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Acessado em: 11 de março de 2013.

RANG, H. P, et al. *Rang & Dale Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 829p.

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

SCHARFSTEIN, J. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. **J Immunol**. v. 137, p. 1336-1341, 1986.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.102, suppl.1, p. 75-86, 2007.

SILVA, J. S. *et al.* TNF α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. **Infect Immun**. v. 63, p. 4862–4867, 1995.

SILVA J. J. *et al.* In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **Br J Pharmacol**. v. 152, n. 1, p. 112-21, 2007.

SILVA, J. J. *et al.* Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 53, p. 4414–4421, 2009.

SILVA, J. J. N. *et al.* Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **Br J Pharmacol**. v. 160, n. 2, p. 260-9, 2010.

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

SOUTO-PADRON, T. *et al.* Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J Cell Sci**. v. 96, p. 485-490, 1990.

STEINDEL, M. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State. Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 60, p. 25–32, 2008.

TFOUNI, E. *et al.* Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes **Nitric Oxide.** v. 26, p. 38–53, 2012.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: Autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ.** v. 12, p. 1528–1534, 2005.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop.** v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun.** v. 62, n. 11, p. 5177-82, 1994.

WAGHABI, M. C. *et al.* Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. **Cell. Microbiol.** v. 7, p. 511–517, 2005.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasites ou vários parasitas da doença de Chagas? **Rev Biol.** v. 6b, p. 44–48, 2011.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol.** v. 12, n. 2, p. 240-53, 2012.

ANEXO