



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO *IN VITRO* E DOS EFEITOS
BIOLÓGICOS *IN VIVO* INDUZIDO PELAS DIBENZILIDENOACETONAS
A3K2A1 E A3K2A3 EM *Trypanosoma cruzi***

DANIELLE LAZARIN BIDÓIA

MARINGÁ

2015

DANIELLE LAZARIN BIDÓIA

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO *IN VITRO* E DOS EFEITOS
BIOLÓGICOS *IN VIVO* INDUZIDO PELAS DIBENZILIDENOACETONAS
A3K2A1 E A3K2A3 EM *Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager.

MARINGÁ

2015

DANIELLE LAZARIN BIDÓIA

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO *IN VITRO* E DOS EFEITOS
BIOLÓGICOS *IN VIVO* INDUZIDO PELAS DIBENZILIDENOACETONAS
A3K2A1 E A3K2A3 EM *Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager
Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Emy Luiza Ishii Iwamoto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª. Dr^ª. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá

Dedico esta tese a Deus, por tudo, e a minha família,
que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ao longo dos anos que resultaram nessa tese, diversas pessoas foram fundamentais a essa construção, me ajudando, me apoiando e me ensinando. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia deixar de reconhecê-las, mesmo sabendo que é praticamente impossível listar todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais para a conclusão desse trabalho.

Começo, como não poderia ser diferente, por agradecer a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

Aos meus pais José Antônio e Neusa, que sempre acreditaram em mim e pelas sábias lições de vida.

Ao meu esposo, Carlos Cristiano, por toda paciência, amor e apoio.

Aos meus filhos, Alexandre e Felipe, presentes de Deus, que trazem tanta luz e alegria para a minha vida, um amor especial. Vocês são a lição mais profunda que vivi de ética, dignidade e amor.

A minha sogra Dalva e meu sogro Carlos, que considero como pais, pelo auxílio e incentivo.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager, não apenas pela sua orientação, mas por toda confiança e compreensão em todos esses anos, e por todo o conhecimento transmitido desde o mestrado.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pela confiança e apoio depositado em mim e pela oportunidade de aprender e ensinar no laboratório.

A Prof^a. Dr^a. Tânia Ueda Nakamura, pela contribuição disponibilizada a minha formação acadêmica e científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela transmissão de seus conhecimentos.

Aos meus amigos Nathielle, Fabianne, Vânia, Solange, Hélito e Jean Henrique, pelos momentos de descontração e alegria, pelo companheirismo, apoio e amizade.

A Erika Izumi, pela sua paciência em me ensinar e auxiliar com os primeiros experimentos, além de todo o seu ensinamento e companheirismo durante o tempo que convivemos juntas no laboratório.

Aos companheiros de laboratório Angelo, Débora, Eliana, Elizandra, Érica, Francielle Guillen, Francielle Garcia, Francieli Peron, Gean, Giuliana, Jéssica, Juliana Cogo, Juliana Kovalczuk, Karen, Lara, Lorena, Mychelle, Nilma, Priscila, Renata, Samara, Thalita, Thaysa, Vanessa e todos os demais, pelo convívio e companheirismo.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

E a todos que estiveram do meu lado durante essa caminhada e contribuíram para concretização deste sonho.

Muito Obrigada!

*“...Toda transformação começa sempre caótica e desconfortável.
Os caminhos conhecidos são seguros e fáceis,
mas só conduzem aos lugares onde já estamos
e não desejamos ficar.*

*O caminho do novo é cheio de riscos, surpresas e cansaço
mas sempre premia os que o escolhem
com a chance de descobrirem e experimentarem
a vida que imaginaram viver.”*

Geraldo Eustáquio de Souza

LAZARIN-BIDÓIA, D 2015. **Avaliação do mecanismo de ação *in vitro* e dos efeitos biológicos *in vivo* induzido pelas dibenzilidenoacetonas A3K2A1 e A3K2A3 em *Trypanosoma cruzi*.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 87 p.

RESUMO

Apesar dos contínuos esforços, os tratamentos disponíveis para portadores da doença de Chagas ainda não são satisfatórios, especialmente na fase crônica da doença. Em estudo anterior, nós reportamos a forte atividade tripanocida das dibenzilidenoacetonas **A3K2A1** e **A3K2A3** contra *Trypanosoma cruzi*. No presente estudo, nós investigamos os mecanismos de ação destes compostos envolvidos na morte do parasito. Nós mostramos que **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram estresse oxidativo nas três formas parasitárias, especialmente tripomastigotas, refletidos por um aumento da produção de espécies oxidantes e redução do sistema antioxidante endógeno. Este desequilíbrio oxidativo culminou em danos em estruturas celulares essenciais de *T. cruzi*, refletida pela peroxidação lipídica e fragmentação do DNA. Consequentemente, **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram alterações vitais em *T. cruzi*, levando à morte do parasito por diferentes vias, incluindo apoptose e autofagia. Além disso, os resultados *in vivo* suportam novos estudos pré-clínicos com protocolos terapêuticos diferentes e utilizando sistemas de liberação modificada, com o objetivo de alcançar melhores resultados para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; dibenzilidenoacetonas; estresse oxidativo; morte celular.

LAZARIN-BIDÓIA, D 2015. **Evaluation of the *in vitro* mechanism of action and of the *in vivo* biological effects induced by A3K2A1 and A3K2A3 dibenzylideneacetones in *Trypanosoma cruzi*.** Ph.D. Thesis, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 87 p.

ABSTRACT

Despite ongoing efforts, the available treatments for patients with Chagas' disease are still unsatisfactory, especially in the chronic phase of the disease. Our previous study reported the strong trypanocidal activity of the dibenzylideneacetones **A3K2A1** and **A3K2A3** against *Trypanosoma cruzi*. In the present study, we investigated the mechanisms of action of these compounds that are involved in parasite death. We showed that **A3K2A1** and **A3K2A3** induced oxidative stress in the three parasitic forms, especially trypomastigotes, reflected by an increase in oxidant species production and reduction of the endogenous antioxidant system. This oxidative imbalance culminated in damage in essential cell structures of *T. cruzi*, reflected by lipid peroxidation and DNA fragmentation. Consequently, **A3K2A1** and **A3K2A3** induced vital alterations in *T. cruzi*, leading to parasite death by different pathway, including apoptosis and autophagy. Moreover, the *in vivo* data support new preclinical studies with different therapeutic protocols and using modified release systems, in order to achieve better results for the development of new chemotherapeutic agents against *T. cruzi*.

Key-Words: *Trypanosoma cruzi*; dibenzylideneacetones; oxidative stress; cell death.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas das dibenzilidenoacetonas (1*E*,4*E*)-2-metil-1-(4-nitrofenil)-5-fenilpenta-1,4-dien-3-ona e (1*E*,4*E*)-2-metil-1,5-bis(4-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona.....27
- Figura 2.** Determinação por fluorimetria de $O_2^{\bullet-}$ em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por até 24 h.....44
- Figura 3.** Determinação por fluorimetria de EROs totais em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 2446
- Figura 4.** Determinação por fluorimetria de óxido nítrico em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h.....48
- Figura 5.** Determinação por citometria de fluxo do $\Delta\Psi_m$ em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h.....49
- Figura 6.** Determinação por espectrofotometria dos níveis de tióis reduzidos em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por até 48 h.....51
- Figura 7.** Determinação da peroxidação lipídica em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h.....53
- Figura 8.** Determinação por citometria de fluxo da integridade da membrana celular em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h.....55
- Figura 9.** Determinação por microscopia de fluorescência e fluorimetria de corpos lipídicos em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h.....57
- Figura 10.** Determinação por citometria de fluxo da exposição de fosfatidilserina em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h.....59

Figura 11. Determinação por citometria de fluxo do ciclo celular em epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com A3K2A1 ou A3K2A3 por 24 h.....	61
Figura 12. Determinação por citometria de fluxo do volume celular em formas parasitárias de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com A3K2A1 ou A3K2A3 por 24 h.....	62
Figura 13. Determinação por microscopia de fluorescência de vacúolos autofágicos em formas parasitárias de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com A3K2A1 ou A3K2A3 por 24 h.....	63
Figura 14. Efeitos de A3K2A1 , A3K2A3 e BZ sobre a parasitemia em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas.....	66
Figura 15. Efeitos de A3K2A1 , A3K2A3 e BZ sobre a taxa de sobrevivência em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas.....	67
Figura 16. Mecanismo proposto da ação tripanocida das dibenzilidenoacetonas A3K2A1 e A3K2A3	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antiparasitária e citotoxicidade de dibenzilidenoacetonas.....27

Tabela 2. Ensaio do potencial de membrana mitocondrial em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h usando o marcador Rodamina 123.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - antimicina A

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

A3K2A1 - (1*E*,4*E*)-2-metil-1-(4-nitrofenil)-5-fenilpenta-1,4-dien-3-ona

A3K2A3 - (1*E*,4*E*)-2-metil-1,5-bis(4-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona

BZ - benznidazol

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CCCP - carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona

céls - células

cm – centímetro

CO₂ – gás carbônico

DAF-FM - 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína

DBA – dibenzilidenoacetona

DCF - diclorofluoresceína

DMEM - meio Dulbecco's modified Eagle's

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

dpi – dia pós infecção

DPPP - difenil-1-pirenilfosfina

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EC₅₀ – concentração efetiva em 50% dos parasitos

EC₉₀ – concentração efetiva em 90% dos parasitos

EROs - espécies reativas de oxigênio

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

FE²⁺ - ferro

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FSC-H – densidade

g – grama

GSH – glutationa

HCl – ácido clorídrico

HEPES-Na – ácido de sódio 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico

HGPRT – hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase

HO[•] - radical hidroxil

H₂DCFDA - 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

IC₅₀ – concentração inibitória de 50% dos parasitos

IC₉₀ – concentração inibitória de 90% dos parasitos

IP - iodeto de propídio

IV – índice de variação

KCl – cloreto de potássio

kDNA - DNA do cinetoplasto

KH - Krebs–Henseleit

l - litro

LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LIT – meio liver infusion tryptose medium

LLCMK₂ – células epiteliais de rim de *Macaca mulata*

M – molar

MC – mediana controle

MDA - malondialdeído

MDC - monodancil cadaverina

MitoSOX - indicador de superóxido mitocondrial [3,8-fenantridina diamina, 5-(6-trifenil fosfonio hexil)-5,6-diidro-6-fenil]

mg – miligrama

min - minuto

ml - mililitro

mM – milimolar

MT – mediana tratado

NaCl – cloreto de sódio

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Na₂HPO₄ – fosfato dissódico

NaH₂PO₄ – fosfato monossódico

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

nm – nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

Opas - Organização Pan Americana da Saúde

oxMitoSOX – MitoSOX oxidado

O₂^{•-} - ânion superóxido

PBS - tampão fosfato-salina

pH - potencial de hidrogênio

PI3-quinase - fosfatidilinositol 3-kinase

Rh123 - rodamina 123

RNA – ácido ribonuclíco

RNase - ribonuclease

SFB - soro fetal bovino

SOD - superóxido dismutase

TBARS – substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

TrxR – Tioredoxina redutase

TR – tripanotona redutase

T(SH)₂ – tripanotona

U.A. - unidades arbitrárias

µg - micrograma

µm - micrômetro

µM – micromolar

°C - graus Celsius

ε - coeficiente de extinção molar

ΔΨ_m - potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2 Quimioterapia da doença de Chagas.....	24
2.3 Dibenzilidenoacetonas	26
2.4 Potenciais alvos da atividade tripanocida de fármacos	27
2.5 Mitocôndria e o estresse oxidativo em <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2.6 Tipos de morte celular	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Equipamentos e material permanente	33
4.2 Substâncias químicas	33
4.3 Meio de Cultura	33
4.3.1 Meio Liver Infusion Tryptose (LIT).....	34
4.3.2 Meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM).....	34
4.4 Parasitos	34
4.5 Cultura de células.....	35
4.6 Animais.....	35
4.7 Compostos	35
4.8 Detecção fluorimétrica de ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) mitocondrial.....	36
4.9 Detecção fluorimétrica de espécies reativas de oxigênio (EROs)	37
4.10 Detecção fluorimétrica de óxido nítrico	37
4.11 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	37
4.12 Avaliação dos níveis de tióis reduzidos	38
4.13 Ensaio de lipoperoxidação	38
4.14 Avaliação da integridade da membrana celular	39
4.15 Avaliação de corpos lipídicos	39
4.16 Detecção da exposição de fosfatidilserina	40
4.17 Análise do ciclo celular.....	40

4.18	Determinação do volume celular	40
4.19	Avaliação de vacúolos autofágicos	41
4.20	Avaliação <i>in vivo</i> em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas	41
4.21	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	A3K2A1 e A3K2A3 aumentam a produção de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial em <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
5.2	A3K2A1 e A3K2A3 aumentam EROs totais em <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
5.3	A3K2A1 e A3K2A3 aumentam óxido nítrico em <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
5.4	A3K2A1 e A3K2A3 induzem despolarização mitocondrial de <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
5.5	A3K2A1 e A3K2A3 diminuem os níveis de tióis reduzidos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
5.6	A3K2A1 e A3K2A3 induzem peroxidação lipídica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
5.7	A3K2A1 e A3K2A3 causam ruptura da membrana celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
5.8	A3K2A1 e A3K2A3 aumentam corpos lipídicos em <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
5.9	A3K2A1 e A3K2A3 induzem exposição de fosfatidilserina em <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	57
5.10	A3K2A1 e A3K2A3 interrompem o ciclo celular na fase sub-G0/G1 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
5.11	A3K2A1 e A3K2A3 diminuem o volume celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
5.12	A3K2A1 e A3K2A3 induzem a formação de vacúolos autofágicos em <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
5.13	A3K2A1 e A3K2A3 reduzem a parasitemia em modelo murino de infecção aguda da doença de Chagas.....	64
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	72
8	REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE 1: Dibenzyldeneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the <i>Trypanosoma cruzi</i> redox system		86

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas foi descrita há mais de 100 anos (CHAGAS, 1909), mas os tratamentos disponíveis ainda são restritos a apenas dois compostos nitroderivados, benznidazol e nifurtimox. Estes compostos têm eficácia limitada, especialmente na fase crônica da doença, e efeitos colaterais graves (COURA, 2009). A doença de Chagas é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, com uma estimativa de 6-7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, principalmente em 21 países da América Latina. No entanto, casos da doença têm sido cada vez mais detectados nos Estados Unidos, Canadá, Europa e países do Pacífico Ocidental (WHO, 2014).

A pesquisa por novos compostos ativos mais eficazes contra a doença de Chagas e desprovidos de efeitos colaterais graves está aumentando (IZUMI et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014). Poucos estudos têm relatado a eficácia de compostos tripanocidas contra as três formas de *T. cruzi* (MENNA-BARRETO et al., 2008; CALEARE et al., 2013), e pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação. A escassez de tais estudos e falta de compostos eficazes e seletivos contra *T. cruzi* pode ser explicado pelo ciclo de vida complexo e formas morfológicas e funcionais distintas deste parasito (KOLLIEN e SCHAUB 2000; MAYA et al., 2007).

Dibenzilidenoacetona (DBA) é uma classe de compostos que têm uma dienona acíclica ligada a grupos arilo em ambas as β posições. Alguns estudos têm demonstrado as propriedades quimioterápicas de DBAs, incluindo efeitos antiplasmódico (AHER et al., 2011) e anticancerígeno (BHANDARKAR et al., 2008; PRASAD et al., 2011; YU et al., 2013; LEE et al., 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa testou *in vitro* uma série de DBAs contra *T. cruzi* e *Leishmania amazonensis* e os resultados mostraram-se interessantes (UD DIN et al., 2014). (1*E*,4*E*)-2-metil-1-(4-nitrofenil)-5-fenilpenta-1,4-dien-3-ona (**A3K2A1**) e (1*E*,4*E*)-2-metil-1,5-bis(4-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona (**A3K2A3**) foram os compostos mais ativos contra *T. cruzi*.

Considerando a atividade tripanocida *in vitro* de **A3K2A1** e **A3K2A3**, o presente estudo procurou caracterizar as alterações bioquímicas e morfológicas induzidas por estes compostos nas três formas parasitárias de *T. cruzi* a fim de elucidar os mecanismos de ação envolvidos na morte celular deste parasito e avaliar os efeitos biológicos *in vivo* em camundongos infectados por *T. cruzi*.

Os nossos resultados forneceram uma visão sobre os mecanismos de ação de **A3K2A1** e **A3K2A3** e sugerem fortemente que estes compostos são eficazes contra as três principais formas parasitárias de *T. cruzi*. Em conjunto, os nossos resultados indicam que os efeitos de **A3K2A1** e **A3K2A3** estão relacionados com um aumento da produção de espécies oxidantes e depleção do sistema antioxidante endógeno, levando à morte do parasito. Além disso, **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram redução significativa nos níveis de parasitemia e melhora na sobrevivência dos animais infectados por *T. cruzi*.

Os assuntos abordados na revisão de literatura proporcionam um melhor entendimento do nosso trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana foi descoberta e descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, que encontrou um parasito flagelado na corrente sanguínea de uma criança febril (CHAGAS, 1909). Carlos Chagas foi responsável por estabelecer a etiologia, ciclo biológico do parasito, identificação do inseto vetor e de seus reservatórios domésticos e silvestres, descrição da doença e ainda o seu diagnóstico (RASSI JÚNIOR et al., 2012).

A doença de Chagas é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina. Entretanto, nas últimas décadas, devido à mobilidade da população, tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países da Europa e alguns países do Pacífico Oriental. Estima-se que cerca de 6-7 milhões de pessoas são portadoras da doença no mundo todo (WHO, 2014). A população afetada por esta infecção é geralmente de baixa renda e escolaridade, que habitam regiões rurais ou comunidades isoladas, com pouco ou nenhum acesso a serviços de saúde e saneamento básico, e uma parte significativa desta população desconhece a doença. Devido a esses fatores, a doença de Chagas é considerada negligenciada porque recebe pouco financiamento para pesquisa, quando comparada a outras doenças, e o conhecimento produzido não é revertido em avanços terapêuticos, em grande parte por falta de interesse das indústrias farmacêuticas (LIESE e SCHUBERT, 2009).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer através da via vetorial, que depende de alguns fatores relacionados tanto ao triatomíneo quanto ao parasito, como grau de antropofilia, tempo entre a picada e a defecação, número e quantidade de evacuações, percentual de formas infectantes nas fezes ou urina, capacidade de penetração do protozoário e a intensidade do prurido causado pela picada (COURA, 2007). Os vetores são insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. Cerca de 140 espécies, pertencentes a três gêneros – *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, já foram identificadas como transmissores da doença (PATTERSON et al., 2009; VALLEJO et al., 2009), sendo que algumas espécies têm especial importância na transmissão da doença ao homem: *Triatoma infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. braziliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (SILVEIRA, 1983). São popularmente conhecidos como “bicho

barbeiro”, possuem hábito noturno e só são capazes de evoluir e procriar realizando a hematofagia em todos os estágios de vida (NEVES, 2005).

No Brasil, a transmissão vetorial foi substancialmente reduzida devido aos avanços tecnológicos empregados no controle das atividades de vigilância epidemiológica e estratégias para a identificação da presença do vetor (SOBREIRA et al., 2001; FERREIRA e SILVA, 2006). Em 2006, o Brasil recebeu o certificado pela Organização Pan Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (Opas/OMS) de eliminação da transmissão pelo principal vetor, o *T. infestans* (WHO, 2007).

Embora a transmissão vetorial ainda seja importante em várias regiões onde as condições de habitações não são adequadas, nos últimos anos tem aumentado os casos de transmissão por via oral através da ingestão de alimentos contaminados contendo triatomíneos ou suas dejeções em diversos estados brasileiros (ROQUE et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009). Em 2005, um surto relacionado à ingestão de caldo de cana ocorreu em Navegantes, Santa Catarina, resultando em 31 casos laboratorialmente confirmados e cinco óbitos (STEINDEL et al., 2008). Posteriormente, em Iguarapé da Fortaleza, Amapá, 26 pessoas foram infectadas devido à ingestão de suco de açaí contaminado (IANNI e MADY, 2005). Em 2011 um surto da doença de Chagas relacionado ao consumo de açaí contaminado foi registrado no estado do Pará e em 2012, este mesmo estado registrou 35 casos da doença, sendo que um dos municípios, Abaetetuba enfrentou um surto (SESPA, 2011; SESPA, 2012). Com base nestes dados, a transmissão oral, pela ingestão de alimentos contaminados, tem sido o modo de transmissão predominante no Brasil nos últimos anos (DIAS et al., 2011). Dados do Ministério da Saúde confirmam isso, pois dos 1.252 casos de doença de Chagas aguda no Brasil, 70% foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e em 22% dos casos não foi identificado à forma de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Outras formas de transmissão incluem a congênita e transfusão sanguínea. A transmissão congênita ocorre principalmente pela via transplacentária e pode causar aborto, prematuridade, retardo de crescimento intrauterino, nati e neomortalidade (BITTENCOURT, 2000; GÜRTLER et al., 2003; CARLIER et al., 2011). A transmissão transfusional constitui um mecanismo de importância epidemiológica na disseminação da doença de Chagas, principalmente nas grandes cidades, onde a prevalência da infecção é mais elevada (NEVES, 2005). Mecanismos menos comuns de transmissão envolvem transplante de órgãos (CAMPOS et al., 2008), acidentes médico-laboratoriais, manejo de animais infectados (HERWALDT, 2001) e pelo leite materno (DIAS, 2006).

A doença de Chagas apresenta duas manifestações clínicas distintas, fase aguda (inicial, rápida, com elevada parasitemia) e crônica (tardia, de lenta evolução e com baixa parasitemia), que variam de acordo com as características do hospedeiro e da cepa infectante (DIAS, 2000). A fase aguda corresponde à infecção e disseminação do parasito no organismo. Na maioria dos casos é assintomática, mas quando sintomática pode apresentar alguns sinais e sintomas, que variam em frequência e intensidade, tais como febre, mal estar, vômito, diarreia, cefaleia e insuficiência cardíaca. Na transmissão vetorial, há sinais de porta da entrada, como chagoma de inoculação, um edema que surge no local de entrada do parasito ou o sinal de Romana, edema bipalpebral unilateral, que ocorre devido à entrada do parasito na conjuntiva ocular (COURA, 2007; COURA e BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI JÚNIOR et al., 2012). Esta fase dura geralmente entre seis e oito semanas, ao fim das quais o quadro febril e a parasitemia tendem a desaparecer. Em paralelo, decrescem também os níveis de anticorpos IgM e sobem os níveis de IgG. Estes elementos praticamente definem a transição para a fase crônica da doença de Chagas (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

A fase crônica está relacionada à reprodução sistêmica, a maioria dos pacientes se mantém assintomáticos, caracterizando a forma indeterminada da doença, onde eletrocardiograma e radiografias apresentam-se normais. A sintomatologia da fase crônica acomete em torno de 30 a 40% dos pacientes, normalmente por um período de 10 a 30 anos após a infecção. Esta fase geralmente é manifestada por comprometimento cardiovascular e/ou gastrointestinal. Estas alterações estão agrupadas em três formas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva, que resultam em significativa morbidade e mortalidade (COURA, 2007; COURA e BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI JÚNIOR et al., 2012).

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário parasito uniflagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, filo Sarcomastigophora e subfilo Mastigophora (BRENER, 1992). Apresenta diferentes formas ao longo de seu ciclo de vida, destacando-se a forma epimastigota - replicativa extracelular, não infectiva - presente no tubo digestivo do inseto vetor; a forma tripomastigota - não replicativa, infectiva - presente nas porções finais do intestino do inseto e na corrente sanguínea de mamíferos infectados; e a forma amastigota - replicativa intracelular, infectiva - presente no interior das células infectadas (DE SOUZA, 1984; DE SOUZA et al., 2010). Todas essas formas do ciclo de vida do parasito podem ser identificadas a partir de características morfométricas (ou morfológicas), tais como a forma do parasito, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela bolsa flagelar (VICKERMAN, 1994). Epimastigota é uma forma

fusiforme com cinetoplasto em forma de bastão próximo da bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge. Amastigota é arredondada e exibe um flagelo reduzido com um núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico, o cinetoplasto encontra-se na forma de bastão entre o núcleo e o flagelo. Tripomastigota apresenta morfologia levemente achatada e alongada, com cinetoplasto arredondado, localizado na parte posterior do parasito, o flagelo emerge da bolsa flagelar, se adere por todo o corpo do parasito e torna-se livre na região anterior (TEIXEIRA et al., 2011).

O ciclo de vida de *T. cruzi* alterna-se entre dois hospedeiros, invertebrado (triatomíneos) e vertebrado (mamíferos), caracterizando-se como heteroxênico (KOLLIEN e SCHAUB, 2000). O ciclo do parasito no hospedeiro vertebrado inicia-se quando o inseto vetor infectado, no momento do repasto sanguíneo, defeca, depositando na pele do mamífero excretas contaminadas com tripomastigotas metacíclicas. Através de uma ferida na pele ou diretamente na mucosa as formas tripomastigotas metacíclicas invadem diversas células, tais como fibroblastos, macrófagos residentes, células musculares lisas e estriadas e neurônios. No interior destas células, as formas tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam e transformam-se novamente em tripomastigotas. Este processo ocasiona o rompimento da célula hospedeira e liberação dos parasitos na corrente sanguínea. No meio extracelular, estes parasitos podem infectar novas células ou serem ingeridos por outro triatomíneo no momento do repasto sanguíneo. No hospedeiro invertebrado, os parasitos migram para o intestino médio do inseto, onde se diferenciam em formas epimastigotas e multiplicam-se. Posteriormente, essas formas migram para a parte posterior do tubo digestivo atingindo o reto, diferenciam-se para tripomastigotas metacíclicas, que, num novo repasto sanguíneo, são eliminadas juntamente com a urina e fezes do triatomíneo. Ao entrar em contato com um novo hospedeiro vertebrado e estabelecer um novo processo de infecção nas células, o ciclo se fecha (COURA e CASTRO, 2002; MAYA et al., 2007).

Trypanosoma cruzi, bem como todos os membros da família *Trypanosomatidae*, apresentam algumas características especiais, como a presença de uma única mitocôndria que se estende por todo o corpo do protozoário. Nesta organela há uma grande quantidade de DNA que se organiza na forma de minicírculos e se concentra em uma determinada região, localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura intramitocondrial, chamada de cinetoplasto. A concentração de DNA encontrada em um cinetoplasto pode representar cerca de 30% do DNA total da célula (DE SOUZA, 2000). Estudos citoquímicos e bioquímicos descrevem ainda a presença de algumas enzimas mitocondriais em *T. cruzi*

incluindo a citocromo oxidase, a succinato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase, a NADPH diaforase, a alfa glicerolfosfato desidrogenase e a beta hidroxibutirato desidrogenase.

Outras características de *T. cruzi* incluem a presença de uma bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo e é um local de intensa endocitose; o acidocalcissoma, responsável pelo armazenamento de íons como cálcio, sódio, zinco, fósforo e magnésio para posterior utilização na célula (DOCAMPO e MORENO, 1999); o glicossomo que compartimentaliza em seu interior enzimas da via glicolítica (MICHELS et al., 2006); o reservossomo, que armazena lipídeos e proteínas, assim como algumas proteases, sendo a cruzipaína ou GP57/51 a proteína mais abundante da família das cisteínas proteases de *T. cruzi*. Esta protease participa na nutrição, diferenciação e interação do parasito com a célula hospedeira (CAZZULO, 2002; APARICIO et al., 2004; DIAS et al., 2009). E, o vacúolo contrátil, que exerce sua função na osmoregulação celular (DE SOUZA, 2009).

2.2 Quimioterapia da doença de Chagas

A quimioterapia para o tratamento de portadores da doença de Chagas ainda constitui um desafio. Mesmo após um século da descoberta da doença de Chagas, os investimentos globais em pesquisa e desenvolvimento de fármacos e vacinas são escassos. O tratamento atual é parcialmente eficaz para essa doença e os únicos fármacos utilizados como quimioterápicos foram introduzidos no mercado há mais de 40 anos. Assim, o fortalecimento de programas de pesquisa que visem o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, menos tóxicos e mais acessíveis para o tratamento de portadores da doença de Chagas faz-se necessário (DUSCHAK e COUTO, 2007; DIAS et al., 2009; GUEDES et al., 2012).

Atualmente existem apenas dois medicamentos eficazes, os nitroderivados benznidazol e nifurtimox, ambos desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas Roche e Bayer, respectivamente (COURA, 2009). Entretanto, no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, após a proibição do uso do nifurtimox, o benznidazol é o único fármaco utilizado para o tratamento de portadores dessa doença (PEDROSA et al., 2001; COURA e CASTRO, 2002). O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) é o atual produtor deste fármaco, e cabe ao governo brasileiro à responsabilidade de distribuí-lo aos demais países da América Latina.

O mecanismo de ação do nifurtimox está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O principal mecanismo de ação do benznidazol está relacionado com a formação de radical nitroânion e metabólitos eletrofílicos (MAYA et al., 2007). Ambos os fármacos atuam sobre o genoma de *T. cruzi*, inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas e aceleram a degradação dessas macromoléculas (STOPPANI, 1999).

Estes quimioterápicos estão longe de ser um fármaco ideal, pois não atendem aos critérios: cura parasitológica de casos agudos e crônicos da infecção; efetivo em uma única dose ou em poucas doses; acessível aos pacientes; não exibir efeitos colaterais ou teratogênicos; não haver necessidade de internação para o tratamento e não apresentar resistência (SOEIRO e CASTRO, 2009). Em adição, a eficiência do tratamento depende da susceptibilidade de diferentes cepas de *T. cruzi* (BOURGUIGNON et al., 2011). Ambos os fármacos são eficazes para o tratamento da fase aguda (PRATA, 2001), com uma taxa de cura de cerca de 80% dos infectados, entretanto em indivíduos cronicamente infectados a eficácia é reduzida para cerca de 20% (COURA, 2009). Além disso, estes compostos podem causar toxicidade sistêmica com sérios efeitos colaterais, sendo a hipersensibilidade (*rash*, febre, edema generalizado, linfadenopatia, dores articulares e musculares), depressão da medula óssea (neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica) e polineuropatia periférica os mais importantes (DUSCHAK e COUTO, 2007; RASSI JÚNIOR et al., 2009). Devido a estes efeitos adversos, muitos pacientes acabam abandonando o tratamento (SILVA JÚNIOR et al., 2008). Essas limitações destacam a urgência de obtenção de novos compostos, sejam eles naturais ou sintéticos, como quimioterápicos contra a doença de Chagas.

A pesquisa por novas drogas pode ser realizada através de ensaios tripanocidas de produtos naturais, semissintéticos e sintéticos, compostos com similaridade química a um fármaco com atividade já estudada, fármaco com eficácia já reconhecida para outras doenças ou por meio de alvos ou rotas metabólicas específicas do parasito (COURA e CASTRO, 2002, SOEIRO e CASTRO, 2009).

Nos últimos anos, o interesse pela busca de novos compostos ativos menos tóxicos e mais eficazes para o tratamento de portadores da doença de Chagas tem aumentado. Diversos produtos naturais, semissintéticos e sintéticos têm mostrado atividade tripanocida. Exemplos disto incluem óleos essenciais obtidos de *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* e *Ocimum basilicum* (SANTORO et al., 2007), eupomatenóide-5 (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013), β -lapachonas semissintéticas (MENNA-BARRETO et al., 2005), L-leucina-metil éster

(ADADE et al., 2007) e quinoxalina (RODRIGUES et al., 2014). Entretanto, apesar dos esforços já realizados, estas substâncias ainda estão longe de se tornarem um fármaco (MAYA et al., 2007). Exemplos disso podem ser encontrados em uma revisão, onde mais de 134 compostos já foram testados na última década contra *T. cruzi* (IZUMI et al., 2011).

2.3 Dibenzilidenoacetonas

Dibenzilidenoacetona (DBA) é uma classe de compostos que contém uma dienona acíclica ligada a grupos arilo em ambas as β -posições. Exibe estrutura similar às chalconas e curcuminóides, que são importantes compostos naturais bioativos encontrados em diversas espécies de plantas (ANTO et al., 1995; CABRERA et al., 2007; LAHTCHEV et al., 2008; MAYDTY et al., 2013). Alguns estudos têm demonstrado as propriedades terapêuticas de DBAs, incluindo antiplasmodial (AHER et al., 2011) e anticâncer (BHANDARKAR et al., 2008; PRASAD et al., 2011; YU et al., 2013; LEE et al., 2014) através de mecanismos de aumento de EROs e indução da morte celular por apoptose.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a eficácia de uma série de DBAs contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e os resultados mostraram-se interessantes (Tabela 1). As substâncias **A3K2A1** e **A3K2A3** foram as mais ativas contra *T. cruzi* (Fig. 1). Adicionalmente, **A3K2A1** e **A3K2A3** provaram serem mais seletivas ao parasito do que às células de mamíferos (UD DIN et al., 2014).

A3K2A1 e **A3K2A3** apresentam em sua estrutura química um ou mais grupos nitros ligados diretamente a um anel aromático, sendo considerados nitrocompostos. Uma pesquisa demonstrou que enzimas nitroredutases, presentes em *L. donovani*, mas ausentes em células de mamíferos, podem ativar substâncias que contém grupos nitro em uma forma mais ativa (SUSAN et al., 2012). De fato, a literatura descreve que a bioatividade de nitrocompostos está relacionada com a redução do grupo nitro para gerar espécies reativas (PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Tabela 1. Atividade antiparasitária e citotoxicidade de dibenzilidenoacetonas.

Compostos	Epimastigota	Tripomastigota	Promastigota	Células LLCMK ₂	Macrófagos MJ774A1
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1a (A1K2)	> 100	>100	>100	687,5 ± 17,68	742,5 ± 81,32
1b (A2K2)	> 100	>100	>100	280,0 ± 28,28	240,0 ± 14,14
1c (A3K2)	82,2 ± 7,42	>100	>100	266,0 ± 12,73	70,5 ± 16,26
1d (A4K2)	> 100	>100	>100	150,0 ± 0,00	160,0 ± 14,14
2a (A1K2A1)	15,9 ± 1,34	71,7 ± 2,33	15,3 ± 0,35	33,6 ± 5,28	34,5 ± 7,78
2b (A1K2A2)	14,3 ± 5,13	>100	20,4 ± 3,32	93,0 ± 9,90	51,0 ± 11,31
2c (A1K2A3)	16,9 ± 0,00	65,0 ± 7,07	11,6 ± 1,70	43,3 ± 4,16	26,0 ± 1,41
2d (A1K2A4)	13,3 ± 2,90	>100	20,0 ± 2,83	53,0 ± 4,24	20,2 ± 3,96
2e (A2K2A1)	16,7 ± 1,41	73,3 ± 4,67	22,3 ± 1,77	44,0 ± 0,00	54,0 ± 8,49
2f (A2K2A2)	23,6 ± 2,33	>100	21,8 ± 0,28	75,0 ± 7,07	34,1 ± 1,75
2g (A2K2A3)	25,2 ± 4,60	>100	14,8 ± 1,77	20,1 ± 6,80	30,0 ± 6,56
2h (A2K2A4)	21,3 ± 0,00	>100	18,0 ± 0,00	411,0 ± 55,15	36,2 ± 4,35
2i (A3K2A1)	3,5 ± 0,35	17,5 ± 2,05	13,4 ± 1,98	264,3 ± 3,25	47,3 ± 4,16
2j (A3K2A2)	10,0 ± 0,00	73,3 ± 0,00	15,5 ± 1,70	172,1 ± 15,77	36,6 ± 1,15
2k (A3K2A3)	1,8 ± 0,21	15,4 ± 4,10	3,4 ± 0,07	32,5 ± 1,20	43,0 ± 4,24
2l (A3K2A4)	14,0 ± 0,00	>100	12,0 ± 0,71	25,9 ± 9,50	24,7 ± 2,52
2m (A4K2A1)	24,1 ± 2,62	78,3 ± 2,40	21,5 ± 0,71	191,0 ± 12,73	28,5 ± 0,71
2n (A4K2A2)	>100	>100	20,1 ± 1,48	285,1 ± 81,81	34,3 ± 5,13
2o (A4K2A3)	>100	>100	>100	167,0 ± 8,49	966,6 ± 57,74
2p (A4K2A4)	25,1 ± 1,27	>100	20,5 ± 2,12	314,3 ± 0,00	10,0 ± 0,00
Benznidazol	6,5 ± 0,7	34,5 ± 7,6		614,7 ± 115,2	
Anfotericina B			0,06 ± 0,00		3,7 ± 0,31

Fonte: Modificado de UD Din et al., 2014

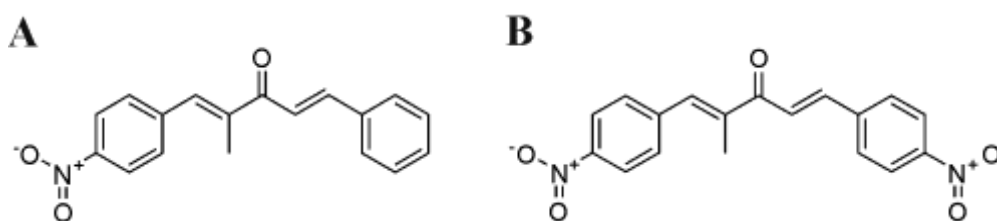


Figura 1 – Estruturas químicas das dibenzilidenoacetonas (1*E*,4*E*)-2-metil-1-(4-nitrofenil)-5-fenilpenta-1,4-dien-3-ona (A) e (1*E*,4*E*)-2-metil-1,5-bis(4-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona (B).

2.4 Potenciais alvos da atividade tripanocida de fármacos

Apesar do aumento de pesquisas envolvendo a busca de novos compostos tripanocidas, a maioria destes acaba sendo inadequado devido à alta toxicidade às células hospedeiras. Assim, para o desenvolvimento de novos quimioterápicos mais eficientes e seletivos para o parasito, a seleção do alvo terapêutico é de suma importância, pois favorece a busca racional por compostos que induzem uma resposta terapêutica específica contra *T. cruzi*. Diante disso, vários processos bioquímicos presentes em *T. cruzi*, mas ausentes nos hospedeiros mamíferos, têm sido apontados como alvos terapêuticos potenciais (BARRET et al., 2003; CROFT et al., 2005; MELOS e ECHEVARRIA, 2012).

Tripanossomatídeos, apesar de serem eucariotos, sintetizam ergosterol, mas não colesterol, como componente essencial das membranas celulares. Portanto, etapas da biossíntese de esteróis distintas em relação à síntese realizada pelas células hospedeiras, são intensamente estudadas como alvo quimioterápico. Dentre elas, destacam-se as enzimas hidroximetilglutaril-coenzima A redutase, squaleno epoxidase, C14 α -esterol desmetilase e esterol 24-C-metiltransferase (MELOS e ECHEVARRIA, 2012).

Em substituição as enzimas glutatona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR), presentes em muitos organismos eucariotos, os tripanossomatídeos possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona T(SH)₂, responsável pela detoxificação de hidroperóxidos (ARIYANAYAGAM e FAIRLAMB, 2001; TURRENS, 2004), sendo um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas ações terapêuticas (DOCAMPO e MORENO, 1990; WILKINSON et al., 2002).

Em *T. cruzi*, as proteases, enzimas responsáveis pela quebra de ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas e peptídeos, apresentam diversas funções, que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasito do sistema imune do hospedeiro (DIAS et al., 2009). Assim, algumas proteases têm sido apontadas como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos fármacos, tais como, cisteína proteases, serina proteases, metaloproteínas e treonina proteases (SAJID e MCKERROW, 2002; SOEIRO e CASTRO, 2009).

Tripomastigotas de *T. cruzi* são altamente dependentes da via glicolítica para a produção de ATP. Assim, essa alta dependência da glicólise como fonte de energia torna as enzimas glicolíticas alvos biológicos atrativos. Dentre elas, destacam-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a hexoquinase e a fosfofrutoquinase (URBINA e CRESPO, 1984; SOUZA et al., 1998; SANZ-RODRIGUEZ et al., 2007; DIAS et al., 2009).

Outro alvo é a enzima *trans*-sialidase, uma glicoproteína de superfície de *T. cruzi*. Esta enzima é responsável pela transferência do ácido siálico para moléculas de mucina, dando

origem a ligações α -2,3 com moléculas de β -galactose aceptoras na superfície do parasito (LEGUIZAMÓN et al., 1994). Além disto, uma vez que *T. cruzi* é deficiente na biossíntese de purinas, outro alvo válido é a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HGPRT) (SOBRINHO et al., 2007).

Por fim, um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas é a mitocôndria, visto ser única em *T. cruzi*. Diversos alvos nesta organela já foram identificados, incluindo kDNA e topoisomerasas, cadeia transportadora de elétrons e síntese de ácidos graxos (WORTHEN et al., 2010; FIDALGO e GILLE, 2011).

2.5 Mitocôndria e o estresse oxidativo em *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi bem como todos os outros membros da família *Trypanosomatidae* exibem uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo do parasito (PAULIN et al., 1975). É uma organela bem desenvolvida, que apresenta um grande número de cristas mitocondriais em todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Além disso, a mitocôndria dos tripanossomatídeos possui uma estrutura intramitocondrial denominada cinetoplasto, localizada abaixo do corpúsculo basal, onde há grande quantidade de DNA organizado na forma de minicírculos, e compreende cerca de 30% do DNA total da célula (DE SOUZA, 2000). O volume mitocondrial abrange aproximadamente cerca de 12% da célula, o que dificulta evitar alterações desta organela durante a ruptura dos parasitos. Por isso, a complexidade ultraestrutural e algumas propriedades básicas dos processos bioenergéticos que acontecem na mitocôndria não são totalmente conhecidas. Assim, as funções mitocondriais destes protozoários têm sido determinadas em células permeabilizadas com digitonina (VERCESI et al., 1991).

A mitocôndria representa o principal local de produção de EROs em condições fisiológicas, visto que diferentes componentes da cadeia respiratória podem converter o oxigênio a radicais $O_2^{\cdot-}$ quando reduzidos (CHANCE et al., 1979; SIPOS et al., 2003). Os principais geradores de EROs da cadeia respiratória são os complexos I e III (TURRENS e BOVERIS, 1980; TURRENS, 2003). O radical superóxido pode ser rapidamente dismutado a H_2O_2 pelas superóxido dismutases (SOD), e este, na presença de Fe^{2+} , gera o radical hidroxil (HO^{\cdot}).

Para evitar o dano celular causado por EROs, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidantes que eliminam estes radicais por redução para água ou alcoóis (PIÑEYRO et al., 2005). Em *T. cruzi*, o sistema antioxidante compreende uma série complexa de enzimas que exibem relevante função na detoxificação de hidroperóxidos. Seu metabolismo redox depende, especialmente, do sistema tripanotiona (IRIGOÍN et al., 2008). A tripanotiona consiste de duas moléculas de glutathione (GSH) ligadas covalentemente por uma unidade de espermidina e é mantida em sua forma reduzida pela enzima tripanotiona redutase (TR). Esta enzima exerce um papel central na proteção contra EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) mediante a reciclagem de tripanotiona oxidada (DUMAS et al., 1997; TOVAR et al., 1998; ROMÃO et al., 2006). Quando há uma situação de estresse oxidativo, onde a produção de EROs/ERNs é excessiva, ocorre a oxidação de macromoléculas, principalmente lipídios, proteínas e DNA, podendo desencadear a morte celular (KIRKINEZOS e MORAES, 2001).

2.6 Tipos de morte celular

Os tipos de morte celular podem ser classificados de acordo com os aspectos funcionais (patológica, fisiológica, programada ou acidental), critérios enzimáticos (com envolvimento ou não de nucleases ou proteases), alterações morfológicas ou características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica). Dentre os tipos de morte celular destacam-se a apoptose, a necrose e a morte autofágica (KROEMER et al., 2009).

A apoptose é um tipo de morte celular programada desencadeada por fatores imunológicos, externos, tóxicos, infecciosos ou, ainda, pela própria necessidade de controle de crescimento e substituição celular (ANDRADE, 2003). Caracteriza-se por diversas alterações morfológicas e bioquímicas, incluindo arredondamento da célula, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, pouca ou nenhuma alteração ultraestrutural nas organelas, prolongamentos (*blebs*) na membrana celular, formação de corpos apoptóticos, externalização da fosfatidilserina e perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (JIMENEZ et al., 2008; KROEMER et al., 2009; DE SOUZA et al., 2010; HORIKAWA e PEÑA, 2011). Estas alterações, independente do estímulo, são decorrentes da ativação de caspases que apresentam importância fundamental no processo de apoptose (PEREIRA, 2006).

Outro tipo de morte celular, a necrose, tem como os principais contribuintes da sua propagação e execução o aumento de cálcio e de EROs, que direta ou indiretamente causam diversos danos aos constituintes celulares, resultando em ruptura de organelas e afetando a integridade celular. Caracteriza-se pelo aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e ruptura da célula (RODRIGUES et al., 2006; KROEMER et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; HORIKAWA e PEÑA, 2011). Estas alterações são decorrentes das alterações lisossomais, que perdem a capacidade de conter as hidrolases (proteases, lipases, glicosidases, nucleases) no seu interior. Estas enzimas livres no citosol são ativadas e iniciam o processo de autólise, degradando praticamente todos os substratos celulares (PEREIRA, 2006). Durante o processo necrótico ocorre liberação do conteúdo celular com consequentes danos às células vizinhas e reação inflamatória local (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004; FESTJENS et al., 2006).

A morte autofágica é um processo celular catabólico que objetiva eliminar componentes citoplasmáticos em condições de estresse (GLICK et al., 2010). Envolve o sistema autofagossomal-lisossomal. Autofagossomos, ou vacúolo autofágico, são vesículas de dupla membrana responsáveis pelo englobamento de constituintes citoplasmáticos durante o *turnover* de organelas. A autofagia, ao contrário da apoptose e da necrose que são processos típicos de morte celular, é geralmente considerada um processo que promove a sobrevivência da célula através da degradação e remodelação celular. Porém, em situações na qual a degradação dos componentes citoplasmáticos é contínua, a autofagia pode resultar em morte celular (KROEMER et al., 2009; BRENNAND et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o mecanismo de ação *in vitro* e os efeitos biológicos *in vivo* induzidos pelas dibenzilidenoacetonas **A3K2A1** e **A3K2A3** em *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar *in vitro* o efeito de **A3K2A1** e **A3K2A3** sobre:

- a produção de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial;
- a produção de EROs totais;
- a produção de óxido nítrico;
- o $\Delta\Psi_m$;
- os níveis de tióis reduzidos;
- a peroxidação lipídica;
- a integridade da membrana celular;
- a formação de corpos lipídicos;
- a exposição de fosfatidilserina;
- o ciclo celular;
- o volume celular;
- a formação de vacúolos autofágicos.

Avaliar *in vivo* o efeito de **A3K2A1** e **A3K2A3** sobre a parasitemia e a taxa de sobrevivência em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e material permanente

Aparelho medidor de pH (Digimed[®]); autoclave vertical (Primatec); balança analítica (Mettler Toledo[®]); banho Maria (HydroSan); centrífuga de eppendorf modelo mikro 200 (Hettich); centrífuga modelo rotosix 32 A (Hettich); citômetro de fluxo (Becton-Dickinson[®]) com Software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, E.U.A.); espectrofluorímetro VICTOR™ X3 (PerkinElmer[®]); espectrofotômetro (Bio-Tek[®]); estufa com 5% de CO₂ a 37 °C (Sanyo); fluxo laminar (VECO); leitor de ELISA Power Wave XS (Bio-Tek[®]); microscópio de fluorescência BX51 (Olympus[®]) com Câmera UC30 (Olympus[®]); microscópio invertido CKX41 (Olympus); microscópio óptico CX31 (Olympus); sonicador (Branson).

4.2 Substâncias químicas

Actinomicina D, antimicina A (AA), soro albumina bovina, carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP), digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO), difenil-1-pirenilfosfina (DPPP), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), monodancil cadaverina (MDC), vermelho do Nilo, penicilina, rodamina 123 (Rh123), ácido tiobarbitúrico e wortmanina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Annexina-V FITC, 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM diacetato), indicador de superóxido mitocondrial [3,8-fenantridina diamina, 5-(6-trifenil fosfonio hexil)-5,6-diidro-6-fenil] (MitoSOX), iodeto de propídio (IP) e RNase foram adquiridos da Invitrogen (Eugene, OR, USA). Estreptomicina foi adquirida da Gibco BRL – Life Technologies (Grand Island, NY, USA). O kit de dosagem de proteína foi adquirido da Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Todos os outros reagentes são de grau analítico.

4.3 Meio de Cultura

4.3.1 Meio Liver Infusion Tryptose (LIT)

Para a preparação do meio Liver Infusion Tryptose (LIT), 4,00 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 20,1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,20 g de glicose, 5,0 g de triptose, 5,0 g de infusão de fígado, 15,0 g de extrato de levedura, 25,0 mg de hemina, 10,0 mg de ácido fólico foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada. Após dissolução dos constituintes do meio o pH foi ajustado para 7,4 e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min (NEVES, 2005).

4.3.2 Meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM)

Para preparação do meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), 3,4 g/l do meio foram dissolvidos em água destilada na temperatura de 15 a 30 °C. Em seguida, foram adicionados 3,7 g/l de NaHCO_3 e 0,29 g/l de L-glutamina e agitado. O pH foi ajustado para 7,2 e imediatamente após, o meio foi esterilizado por filtração utilizando membrana com porosidade de 0,22 μm .

4.4 Parasitos

Neste estudo foram utilizadas as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi* cepa Y (PEREIRA DA SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

Formas epimastigotas foram mantidas a 28 °C por transferências semanais em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (CAMARGO, 1964), suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino).

Formas tripomastigotas e amastigotas foram mantidas através da infecção de células de linhagem contínua LLCMK₂ (células epiteliais de rim de *Macaca mulata*, CCL-7; American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA), em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle) suplementado com 2 mM de L-glutamine, 10% de SFB, 5000 U/ml de penicilina e 5 mg/ml de estreptomicina, a 37 °C e 5% de CO_2 na razão de 10 tripomastigotas por célula contadas em câmara de Neubauer (VALDEZ et al., 2009; VEIGA-SANTOS et al.,

2010). Os parasitos foram separados por centrifugação diferencial de $850 \times g$ por 5 min. Tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante e amastigotas foram coletadas do pellet.

4.5 Cultura de células

Células de linhagem contínua LLCMK₂ foram cultivadas em garrafas plásticas com tampa de rosca e dispositivo de entrada de CO₂ (TPP[®]), em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 5000 U/ml de penicilina e 5 mg/ml de estreptomicin a 37 °C em estufa com tensão de 5% de CO₂. A observação da cultura celular foi realizada diariamente em microscópio invertido, e o meio foi trocado quando observado pH ácido. Após a formação da monocamada celular, a fim de promover a manutenção das células de linhagem contínua, as células foram tripsinizadas por 1 min, ressuspensas em meio DMEM contendo 10% de SFB e transferidas para novas garrafas.

4.6 Animais

Camundongos BALB/c machos (isogênicos) com idade entre 4 e 6 semanas (20-25 g) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Foram ambientados no biotério do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá por sete dias antes de serem experimentalmente infectados. Foram colocados em cada gaiola 5 camundongos. A temperatura foi mantida entre 18 a 22 °C e a umidade entre 45 a 55%, em ciclo claro/escuro de 12 h. Os animais foram alimentados com ração e água. Este projeto foi devidamente submetido à aprovação pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentações (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá para realização dos experimentos *in vivo* (n°. 029/2014).

4.7 Compostos

Os compostos (1*E*,4*E*)-2-metil-1-(4-nitrofenil)-5-fenilpenta-1,4-dien-3-ona (**A3K2A1**) e (1*E*,4*E*)-2-metil-1,5-bis(4-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona (**A3K2A3**) foram sintetizados pela equipe do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

As soluções estoques de **A3K2A1** e **A3K2A3** foram preparadas assepticamente em DMSO e diluídos em meio de cultura de modo a que a concentração de DMSO não excedesse a 1% nos ensaios.

As concentrações de **A3K2A1** e **A3K2A3** que foram utilizadas em todos os ensaios foram baseadas nas concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos. Formas epimastigotas (1×10^6 céls/ml) foram tratadas a 28 °C com IC₅₀ (IC_{50A3K2A1}: 3,5 µM; IC_{50A3K2A3}: 1,8 µM) e IC₉₀ (IC_{90A3K2A1}: 9,0 µM; IC_{90A3K2A3}: 7,5 µM). Formas amastigotas (1×10^7 céls/ml) foram tratadas a 37 °C com o IC₅₀ (IC_{50A3K2A1}: 3,9 µM; IC_{50A3K2A3}: 1,2 µM) e IC₉₀ (IC_{90A3K2A1}: 32,9 µM; IC_{90A3K2A3}: 29,5 µM). Formas tripomastigotas (1×10^7 céls/ml) foram tratadas a 37 °C com concentrações que foram efetivas contra 50% (EC_{50A3K2A1}: 17,5 µM; EC_{50A3K2A3}: 15,4 µM) e 90% (EC_{90A3K2A1}: 27,8 µM; EC_{90A3K2A3}: 27,6 µM) da viabilidade do parasito.

4.8 Detecção fluorimétrica de ânions superóxido (O₂^{•-}) mitocondrial

Formas parasitárias de *T. cruzi* foram colhidas e lavadas com tampão KH (Krebs–Henseleit) (pH 7,3), contendo 15 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 120 mM NaCl, 0,7 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM NaH₂PO₄. Em seguida, foi adicionado as células 2,0 ml do reagente MitoSOX 5 µM. Os parasitos foram incubados durante 10 min a temperatura ambiente, protegidos da luz. O MitoSOX é um corante altamente seletivo para a detecção de O₂^{•-} mitocondrial. Uma vez dentro da mitocôndria, o corante é oxidado pelo superóxido e o produto da oxidação torna-se altamente fluorescente ao ligar-se aos ácidos nucléicos. Após o período de incubação, os parasitos foram lavados três vezes com o mesmo tampão e tratados com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por até 24 h. Como controle positivo foi utilizado AA 10 µM. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 510 e 580 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro (PIACENZA et al., 2007).

4.9 Detecção fluorimétrica de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas com 10 μ M de H₂DCFDA por 45 min, protegidos da luz. O H₂DCFDA é um marcador não fluorescente que sofre clivagem dos grupos acetatos por esterases intracelulares, sendo oxidado e convertido em diclorofluoresceína (DCF) que é altamente fluorescente na presença de EROs. Como controle positivo foi utilizado H₂O₂ 20 mM. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 488 e 530 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro (SHUKLA et al., 2012).

4.10 Detecção fluorimétrica de óxido nítrico

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas com 1 μ M de DAF-FM diacetato por 30 min, protegidos da luz. Após a incubação, os parasitos foram lavados, ressuspensos em PBS e incubados por mais 15 min. DAF-FM diacetato é um reagente não fluorescente que é desacetilado por esterases intracelulares e emite fluorescência quando reage com óxido nítrico. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 495 e 515 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro.

4.11 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m)

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas com 5 μ g/ml de Rh123 por 15 min a 37 °C, a fim de verificar o $\Delta\Psi$ m. A Rh123 é sequestrada pela mitocôndria íntegra, desse modo, células com potencial mitocondrial inalterado captam a Rh123 e emitem alta fluorescência. Ao contrário, alterações no $\Delta\Psi$ m levam ao efluxo da Rh123 de dentro da mitocôndria, gerando eventos com baixa fluorescência. Assim, após o período de incubação inicial com Rh123, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS para análise em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Alterações na fluorescência de Rh123 foram quantificadas

através de um índice de variação (IV) obtido pela equação $(MT - MC)/MC$, onde MT é a mediana de fluorescência para parasitos tratados e MC para o controle de parasitos. Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (MENNA-BARRETO et al., 2009). CCCP 100 μ M foi utilizado como controle positivo.

4.12 Avaliação dos níveis de tióis reduzidos

No sistema tripanotona, tripanotona é reduzida a um ditiol $T(SH)_2$ pela enzima TR. A inibição da TR diminui os níveis de tióis reduzidos (SHUKLA et al., 2012). Os níveis de tióis reduzidos foram avaliados usando DTNB, um marcador que em contato com tióis reduzidos forma um cromógeno de cor amarela que pode ser detectado em espectrofotômetro. Para isso, formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 3, 24 e 48 h foram centrifugadas, ressuspensas em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 2,5) e sonicadas. O pH ácido foi usado durante a sonicação para prevenir a oxidação dos grupos tióis livres. Os restos celulares foram removidos por centrifugação e 100 μ l do sobrenadante e 100 μ l de tampão fosfato 500 mM (pH 7,5) foram adicionados em placa de 96 poços, seguido da adição de 20 μ l de DTNB 1 mM. A absorbância foi medida a 412 nm.

4.13 Ensaio de lipoperoxidação

A extensão da peroxidação lipídica foi determinada como quantidade de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em termos de malondialdeído (MDA) e através do marcador DPPP.

Para o ensaio de MDA, formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram lisadas por congelamento e aquecimento das amostras. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva de calibração com soro albumina bovina. A peroxidação lipídica foi determinada como a quantidade de TBARS em termos MDA. Para isto, 0,2-0,5 mg de proteína por amostra foram aquecidas em uma solução contendo, 0,37% de ácido tiobarbitúrico, 15% de ácido tricloroacético e HCl 0,25 N a 95 °C, por 45 min. Após o

resfriamento, a absorvância foi determinada em leitor de ELISA em 532 nm e a concentração de TBARS calculada baseada no valor ϵ de $153\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (POMPELLA et al., 1987).

Para o ensaio de DPPP, formas parasitárias de *T. cruzi* foram tratadas com as mesmas concentrações e nas mesmas condições descritas acima. Após, os parasitos foram incubados com $50\ \mu\text{M}$ de DPPP durante 15 min a temperatura ambiente. DPPP é essencialmente não fluorescente até ser oxidado a um óxido de fosfina (DPPP-O) por peróxidos (OKIMOTO et al., 2000). H_2O_2 20 mM foi utilizado como controle positivo. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 355 e 460 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro.

4.14 Avaliação da integridade da membrana celular

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas com $0,2\ \mu\text{g/ml}$ de IP por 10 min em temperatura ambiente. Células com membrana íntegra captam pouco IP, apresentando baixa fluorescência, porém, células cuja membrana esteja alterada permitirão entrada de IP, que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência. A aquisição de dados e análise foram realizadas imediatamente após a marcação em um citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Alterações na fluorescência do IP foram quantificadas como percentual de células alteradas para membrana plasmática (MENNA-BARRETO et al., 2009). Digitonina $40\ \mu\text{M}$ foi utilizada como controle positivo.

4.15 Avaliação de corpos lipídicos

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas com $10\ \mu\text{g/ml}$ de vermelho do Nilo por 30 min em temperatura ambiente. Vermelho do Nilo é um marcador fluorescente que se acumula em corpos lipídicos. O acúmulo de corpos lipídicos nos parasitos foi observado em microscópio de fluorescência e as imagens capturadas em uma câmera UC30 (STEFANELLO et al., 2014). Adicionalmente, a

fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 e 535 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro.

4.16 Detecção da exposição de fosfatidilserina

A exposição de fosfatidilserina foi detectada utilizando o marcador Annexina-V FITC, uma proteína de ligação para fosfolipídios dependentes de cálcio. Para isso, formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas lavadas e ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação (140 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 10 mM de HEPES-Na, pH 7,4), seguido da adição de 5 µl de Annexina-V FITC por 15 min em temperatura ambiente. Após, 400 µl de tampão de ligação e 50 µl de IP foram adicionados. AA 125 µM foi utilizada como controle positivo. A aquisição de dados e análise foram realizadas imediatamente após a marcação em um citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Parasitos marcados com Annexina-V FITC (IP positivo ou negativo) foram consideradas apoptóticas, e parasitos que foram apenas IP positivo foram consideradas necróticas (JIMENEZ et al., 2008).

4.17 Análise do ciclo celular

Epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram fixadas em metanol/PBS 70% (v/v) a 4 °C durante 1 h. Após, os parasitos foram lavados e incubados em PBS suplementado com 10 µg/ml de IP e 20 µg/ml de RNase a 37° C durante 45 min. A aquisição de dados e análise foram realizadas imediatamente após a marcação em um citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. A porcentagem de células em cada estágio do ciclo celular foi determinada (FERREIRA et al., 2011).

4.18 Determinação do volume celular

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram lavadas duas vezes em PBS, e ressuspensas no mesmo tampão. Em seguida, o volume celular foi analisado por citômetro de fluxo FACSCalibur. Gráficos da densidade (FSC-H) versus a dispersão (Counts) representam a aquisição de 10.000 eventos. Histogramas e análises foram realizados utilizando o software CellQuest (JIMENEZ et al., 2008). Foi utilizado como controle positivo 20 mM de Actinomicina D.

4.19 Avaliação de vacúolos autofágicos

Formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h foram incubadas com 0,05 mM de MDC em PBS por 10 min. MDC é um marcador fluorescente que se acumula dentro de vacúolos autofágicos. Após, as células foram lavadas duas vezes com PBS. (MUNAFO e COLOMBO, 2001; BIEDERBICK et al., 1995). Como controle de autofagia, as células foram pré-tratadas com 0,5 µM de wortmanina, um potente inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase), uma enzima que está envolvida na regulação da autofagia (BLOMMAART et al., 1997). O acúmulo de vacúolos autofágicos nos parasitos foi observado em microscópio de fluorescência e as imagens capturadas em uma câmera UC30 e a intensidade de fluorescência foi avaliada por ImageJ 1.44o. (JIMENEZ et al., 2008).

4.20 Avaliação *in vivo* em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas

Camundongos BALB/c machos foram infectados com inóculo padrão de 10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* (PEREIRA DA SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) por via intraperitoneal. O tratamento foi iniciado 24 h após infecção, sendo realizado por um período de 20 dias. A administração de **A3K2A1** e **A3K2A3** e do fármaco benznidazol foi realizada por via oral em diferentes concentrações. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (5 animais por grupo): (1) não infectado e tratado com o solvente (óleo de milho) por via oral; (2) infectado e tratado com o solvente (óleo de milho) por via oral; (3) infectado e tratado com benznidazol (5 mg/kg/dia) por via oral; (4) infectado e tratado com benznidazol (100 mg/kg/dia) por via oral; (5) infectado e tratado com **A3K2A1** (5 mg/kg/dia) por via oral; (6) infectado e tratado com **A3K2A1** (100 mg/kg/dia) por via oral;

(7) infectado e tratado com **A3K2A1** (5 mg/kg/dia) + benznidazol (5 mg/kg/dia) por via oral; (9) infectado e tratado com **A3K2A3** (5 mg/kg/dia) por via oral; (9) infectado e tratado com **A3K2A3** (100 mg/kg/dia) por via oral; (10) infectado e tratado com **A3K2A3** (5 mg/kg/dia) + benznidazol (5 mg/kg/dia) por via oral. A parasitemia foi avaliada diariamente do 3° ao 21° após a infecção através da contagem em microscópio óptico com 5 µl de sangue coletado da cauda dos animais (BRENER, 1962). Adicionalmente, a mortalidade foi verificada diariamente até o 21° após a infecção e foi expressa em porcentagem de sobrevivência.

4.21 Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do software Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas entre os valores foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) one-way ou two-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Bonferroni. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 A3K2A1 e A3K2A3 aumentam a produção de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial em *Trypanosoma cruzi*

Inicialmente avaliamos a produção de $O_2^{\bullet-}$ em parasitos que tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** usando o marcador fluorescente MitoSOX por fluorimetria. Um aumento significativo tempo-dependente na produção de $O_2^{\bullet-}$ foi observado em tripomastigotas e amastigotas em todas as concentrações de ambos os compostos quando comparado com o grupo controle (Fig. 2). Para epimastigotas, o aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ foi significativo após 5 h de tratamento quando comparado com o grupo controle. Este aumento foi mais pronunciado em tripomastigotas (aproximadamente 120% para **A3K2A1** e **A3K2A3**; Fig. 2A) do que em amastigotas (aproximadamente 95% para **A3K2A1** e **A3K2A3**; Fig. 2B) e epimastigotas (aproximadamente 50% para **A3K2A1** e **A3K2A3**; Fig. 2C). O controle positivo, AA, também induziu um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ de 97%, 84% e 48% em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Estes dados mostram que **A3K2A1** e **A3K2A3** aumentaram a produção de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial.

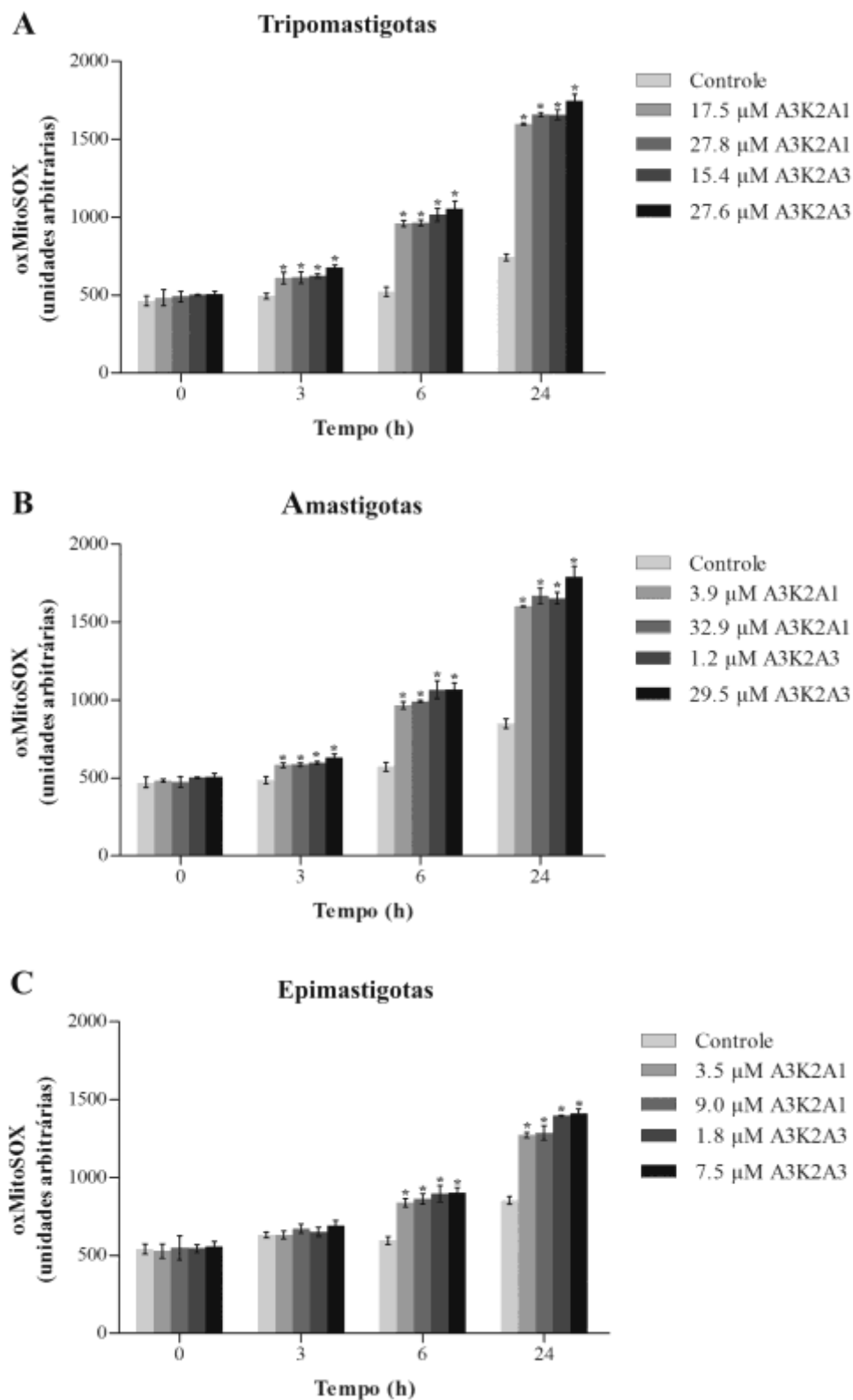


Figura 2. Determinação por fluorimetria de $O_2^{\cdot -}$ em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com A3K2A1 ou A3K2A3 por até 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador fluorescente MitoSOX. (A) Tripomastigotas. (B) Amastigotas. (C) Epimastigotas. Nos tempos indicados, parasitos foram utilizados para medir fluorimetricamente MitoSOX oxidado (oxMitoSOX). Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.2 A3K2A1 e A3K2A3 aumentam EROs totais em *Trypanosoma cruzi*

Espécies reativas de oxigênio são moléculas derivadas da redução incompleta de um elétron do oxigênio molecular e, altas concentrações podem induzir danos oxidativos (CADENAS e DAVIES, 2000). Baseado no aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial descrito acima, nós avaliamos EROs totais em parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** usando o marcador H_2DCFDA por fluorimetria. Figura 3 mostra um aumento significativo de EROs totais em todas as formas parasitárias tratadas com todas as concentrações de ambos os compostos após 24 h de tratamento quando comparado com o grupo controle. **A3K2A1** e **A3K2A3** causaram um efeito maior em formas tripomastigotas, com um aumento de EROs totais de até 2,0 e 3,5 vezes, respectivamente (Fig. 3A). Para amastigotas, **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram um aumento de EROs totais de até 1,7 e 2,2 vezes, respectivamente (Fig. 3B). Para epimastigotas, **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram um aumento de EROs totais de até 1,6 e 2,0 vezes, respectivamente (Fig. 3C). O controle positivo, H_2O_2 , também induziu um aumento de EROs totais de 1,7, 1,5 e 1,5 vezes em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Portanto, **A3K2A1** e **A3K2A3** aumentaram o metabolismo oxidativo de *T. cruzi*.

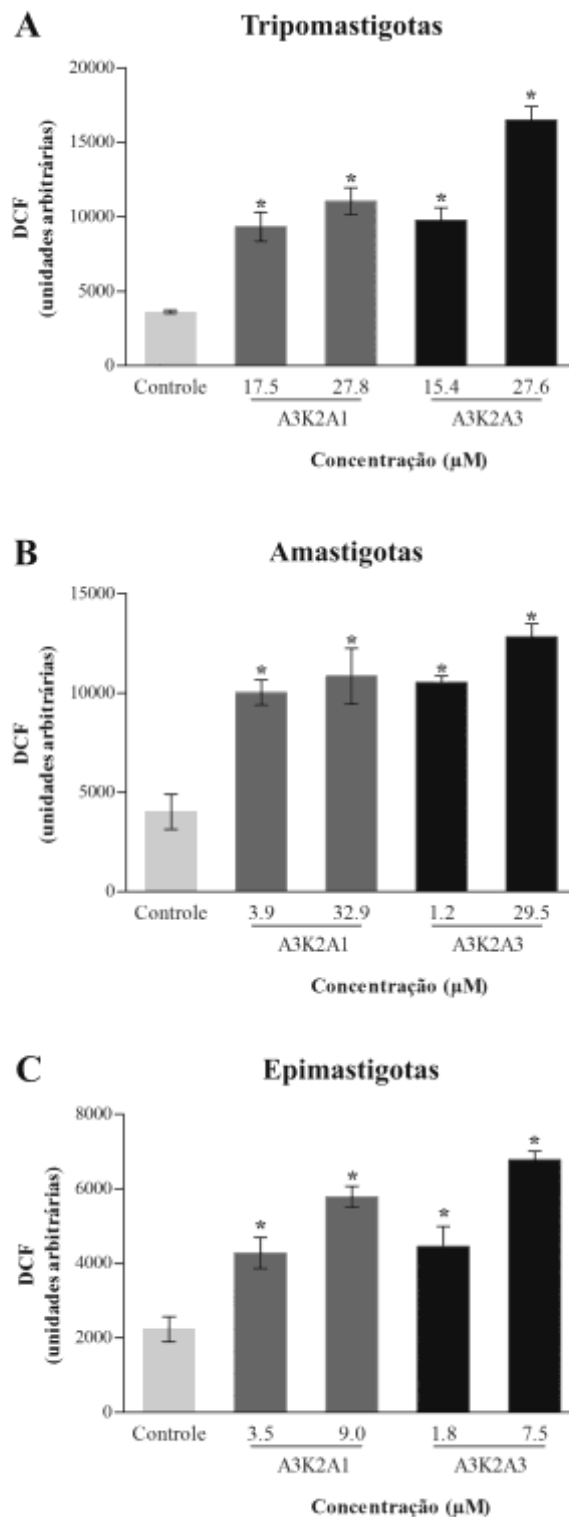


Figura 3. Determinação por fluorimetria de EROs totais em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador não-fluorescente H₂DCFDA. Parasitos pré-marcados com H₂DCFDA foram incubados com **A3K2A1** ou **A3K2A3** e a fluorescência de DCF foi medida. (A) Tripomastigotas. (B) Amastigotas. (C) Epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.3 A3K2A1 e A3K2A3 aumentam óxido nítrico em *Trypanosoma cruzi*

O experimento anterior demonstrou que **A3K2A1** e **A3K2A3** aumentam EROs totais. Nós então avaliamos se estes compostos também aumentam ERNs. Para isso, avaliamos a produção de óxido nítrico, um radical livre de curta duração que pode reagir com proteínas e ácidos nucleicos, usando o marcador fluorescente DAF-FM diacetato por fluorimetria (ALI et al., 2012). Parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** exibiram um aumento significativo de óxido nítrico após 24 h de tratamento quando comparado com o grupo controle (Fig. 4). Este aumento foi mais notável para tripomastigotas (até 292% e 330% para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 4A), seguido por amastigotas (até 163% e 258%; Fig. 4B) e epimastigotas (até 90% e 237%; Fig. 4C). Estes dados demonstram que **A3K2A1** e **A3K2A3** alteram o equilíbrio redox no parasito.

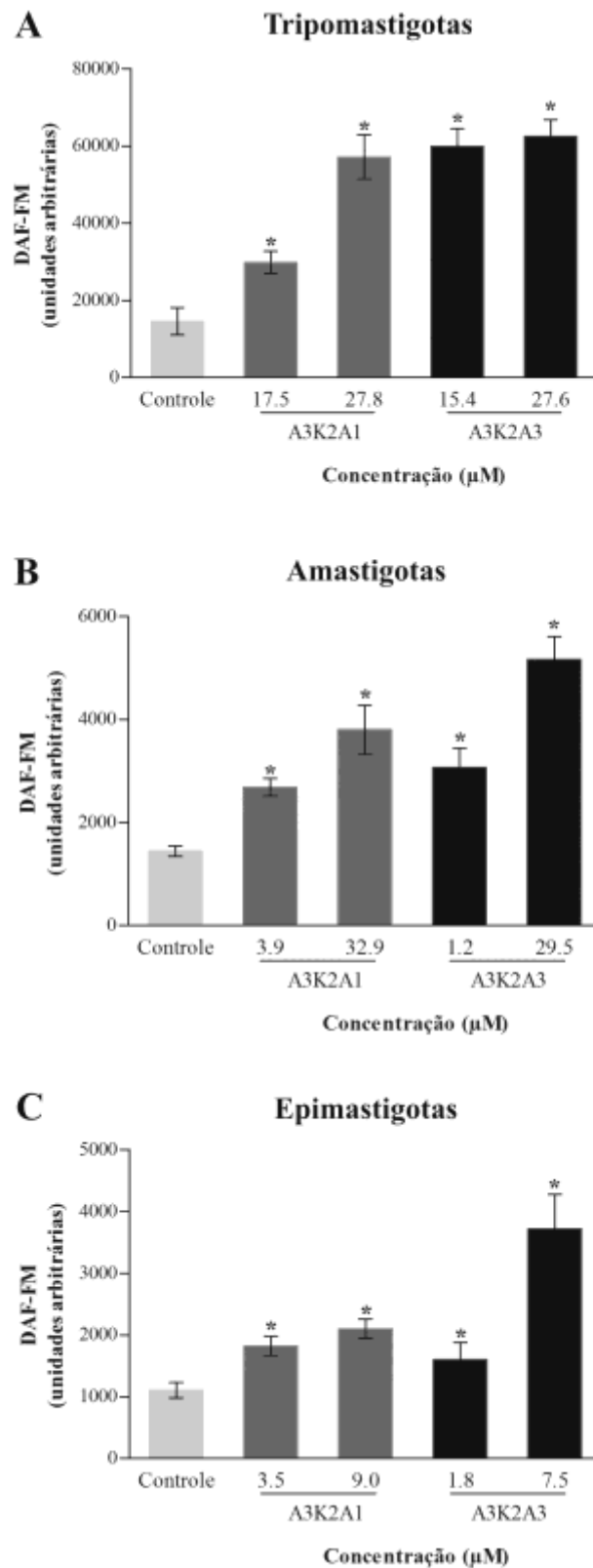


Figura 4. Determinação por fluorimetria de óxido nítrico em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador DAF-FM diacetato. (A) Tripomastigotas. (B) Amastigotas. (C) Epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.4 A3K2A1 e A3K2A3 induzem despolarização mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*

Aumentos de EROs/ERNs podem induzir alterações no $\Delta\Psi_m$. The $\Delta\Psi_m$ é essencial para a manutenção da cadeia respiratória e, uma perda significativa do $\Delta\Psi_m$ torna as células desprovidas de energia com subsequente morte (JOSHI; BAKOWSKA, 2011). Assim, nós avaliamos o $\Delta\Psi_m$ em parasitos que foram tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** usando o marcador fluorescente Rh123 por citometria de fluxo. Os histogramas mostram uma redução acentuada na intensidade de fluorescência total de Rh123 nas três formas parasitárias após 24 h de tratamento com **A3K2A1** e **A3K2A3**, indicando despolarização mitocondrial (Fig. 5, Tabela 2). A perda do $\Delta\Psi_m$ foi dose-dependente e significativamente diferente em todas as concentrações testadas de ambos os compostos quando comparado com o grupo controle. No entanto, a perda do $\Delta\Psi_m$ foi mais pronunciada em tripomastigotas e amastigotas, em que reduções no $\Delta\Psi_m$ maiores que 80% foram observados em todas as concentrações de ambos os compostos. O controle positivo, CCCP, induziu danos no $\Delta\Psi_m$ de 89,7%, 74,4% e 90,5% em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Essas alterações no $\Delta\Psi_m$ afetaram a função mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular.

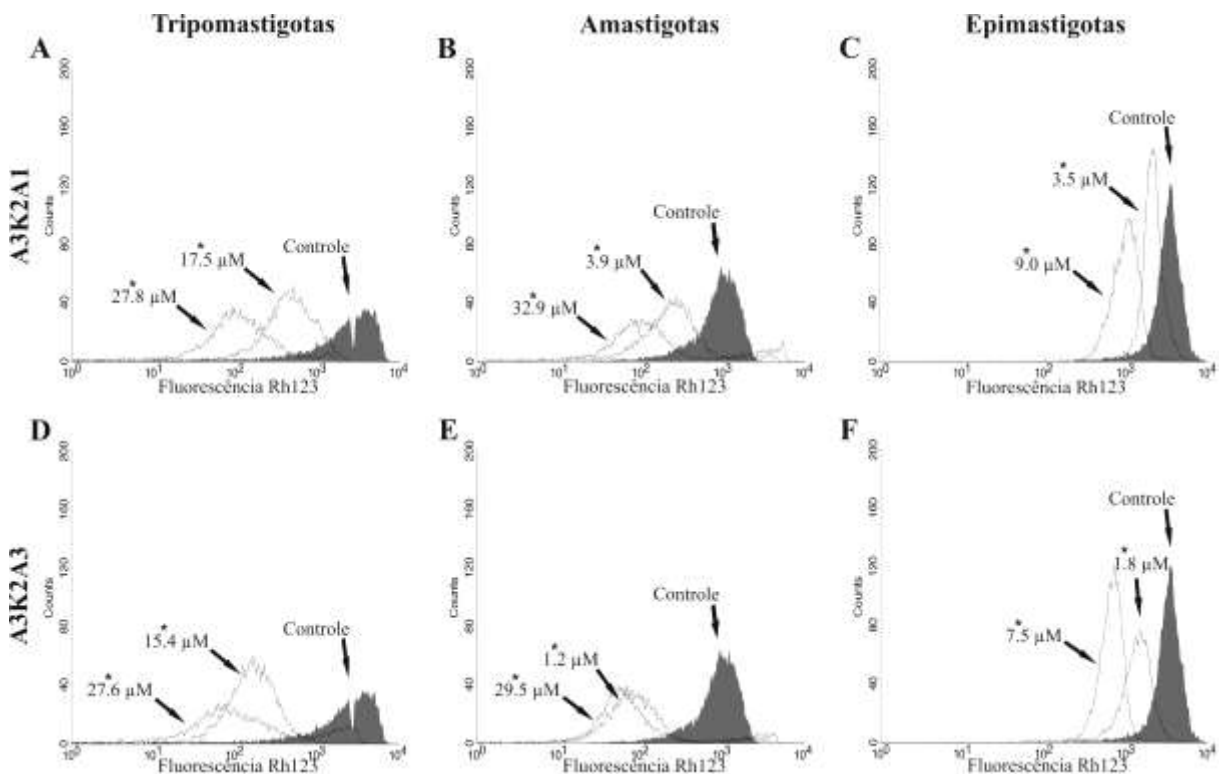


Figura 5. Determinação por citometria de fluxo do $\Delta\Psi_m$ em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador Rh123. (A,D) Tripomastigotas. (B,E)

Amastigotas. (C,F) Epimastigotas. Setas correspondem às concentrações testadas. Grupo controle (parasitos não tratados) também é mostrado. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0.05$).

Tabela 2. Ensaio do potencial de membrana mitocondrial em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h usando o marcador Rodamina 123.

Tripomastigotas			Amastigotas			Epimastigotas		
μM	Mediana	IV ^a	μM	Mediana	IV ^a	μM	Mediana	IV ^a
Controle	774,05	0,00	Controle	1816,50	0,0	Controle	2722,82	0,0
17,5 A3K2A1	136,39*	-0,82	3,9 A3K2A1	359,70*	-0,80	3,5 A3K2A1	894,25*	-0,67
27,8 A3K2A1	88,69*	-0,89	32,9 A3K2A1	258,49*	-0,86	9,0 A3K2A1	797,16*	-0,71
15,4 A3K2A3	129,44*	-0,83	1,2 A3K2A3	272,02*	-0,85	1,8 A3K2A3	762,66*	-0,72
27,6 A3K2A3	57,49*	-0,93	29,5 A3K2A3	172,74*	-0,90	7,5 A3K2A3	515,98*	-0,81

IV^a = $(M_T - M_C)/M_C$, onde M_T corresponde a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e M_C dos parasitos controle.

5.5 A3K2A1 e A3K2A3 diminuem os níveis de tióis reduzidos de *Trypanosoma cruzi*

Os resultados dos experimentos anteriores sugeriram que **A3K2A1** e **A3K2A3** podem induzir um desequilíbrio oxidativo em *T. cruzi*, atribuível ao aumento de EROs/ERNs. Estresse oxidativo é um resultado do aumento da formação de radicais livres e/ou um defeito nas defesas antioxidantes (BIRBEN et al., 2012). Assim, nosso próximo passo foi avaliar os níveis de tióis reduzidos usando o marcador DTNB por espectrofotometria. Parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** exibiram uma diminuição nos níveis de tióis reduzidos em todas as concentrações e tempos testados quando comparado com o grupo controle (Fig. 6), com uma diminuição significativa somente após 48 h de tratamento. Tripomastigotas foram as mais sensíveis às ações de **A3K2A1** e **A3K2A3**, exibindo diminuições em torno de 40% e 50% nos níveis de tióis reduzidos após 48 h de tratamento (Fig. 6A). Para amastigotas e epimastigotas, as diminuições variaram de 10% a 35%.

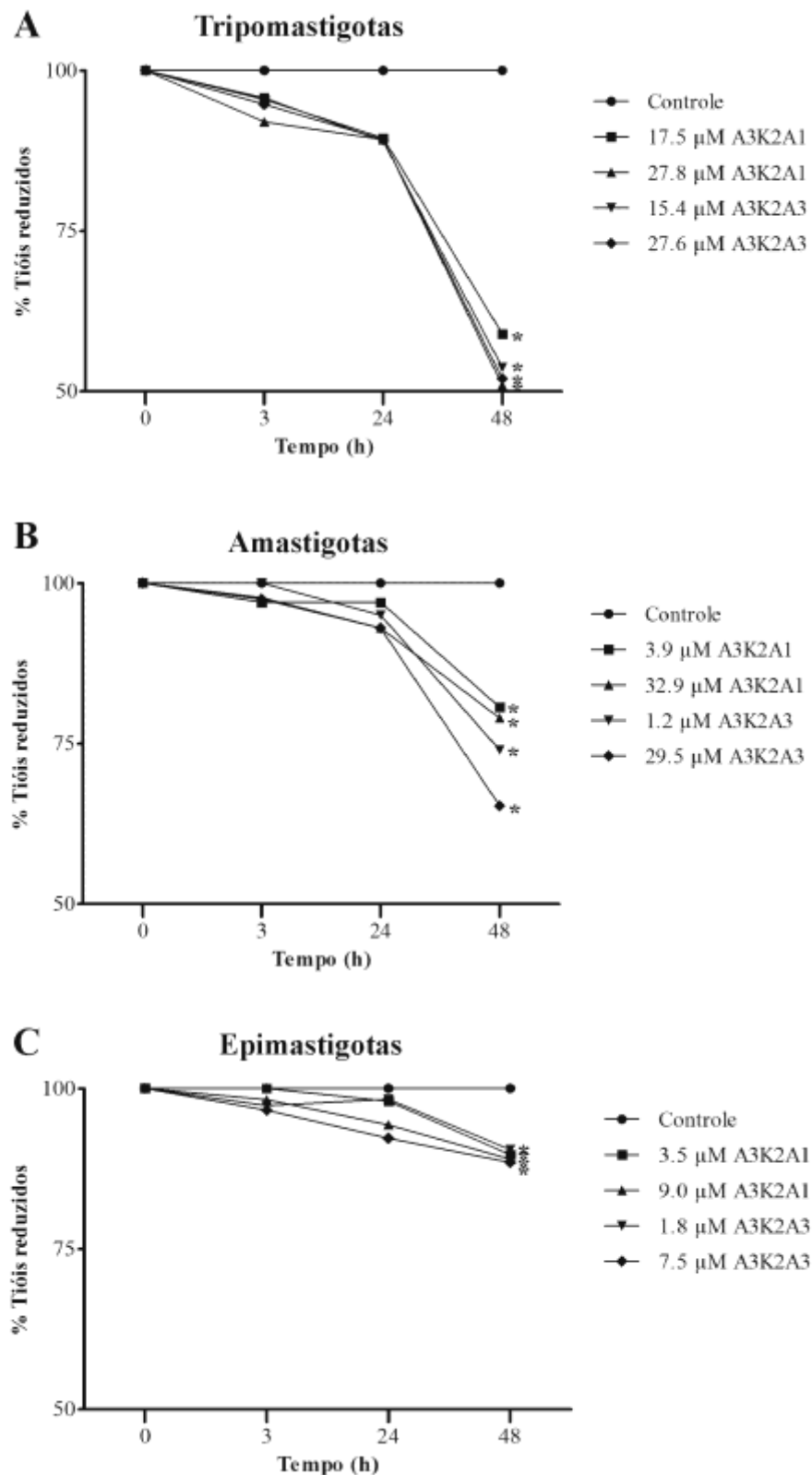


Figura 6. Determinação por espectrofotometria dos níveis de tióis reduzidos em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por até 48 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador DTNB. (A) Tripomastigotas. (B) Amastigotas. (C) Epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.6 A3K2A1 e A3K2A3 induzem peroxidação lipídica em *Trypanosoma cruzi*

Nosso experimento anterior demonstrou que **A3K2A1** e **A3K2A3** podem induzir dano oxidativo em *T. cruzi*, atribuível ao aumento da produção de EROs/ERNs e uma diminuição da atividade da TR. Nós então avaliamos a peroxidação lipídica de parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** usando MDA por espectrofotometria e DPPP por fluorimetria. Figura 7 mostra que parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** exibiram um aumento significativo da peroxidação lipídica em todas as concentrações testadas quando comparado com o grupo controle. No ensaio de MDA, o aumento foi mais pronunciado para tripomastigotas (até 1,3 e 1,6 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 7A), seguido por amastigotas (até 0,7 e 1,0 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 7C) e epimastigotas (até 0,7 e 0,9 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 7E). No ensaio de DPPP, o aumento da peroxidação lipídica foi mais pronunciado em tripomastigotas (até 1,1 e 1,4 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 7B) do que em amastigotas (até 0,7 e 1,0 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 7D) e epimastigotas (até 0,6 e 0,8 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 7F). H₂O₂ também induziu aumento de 0,9, 0,7 e 0,3 vezes da peroxidação lipídica em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Como esperado, **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram dano oxidativo em *T. cruzi*.

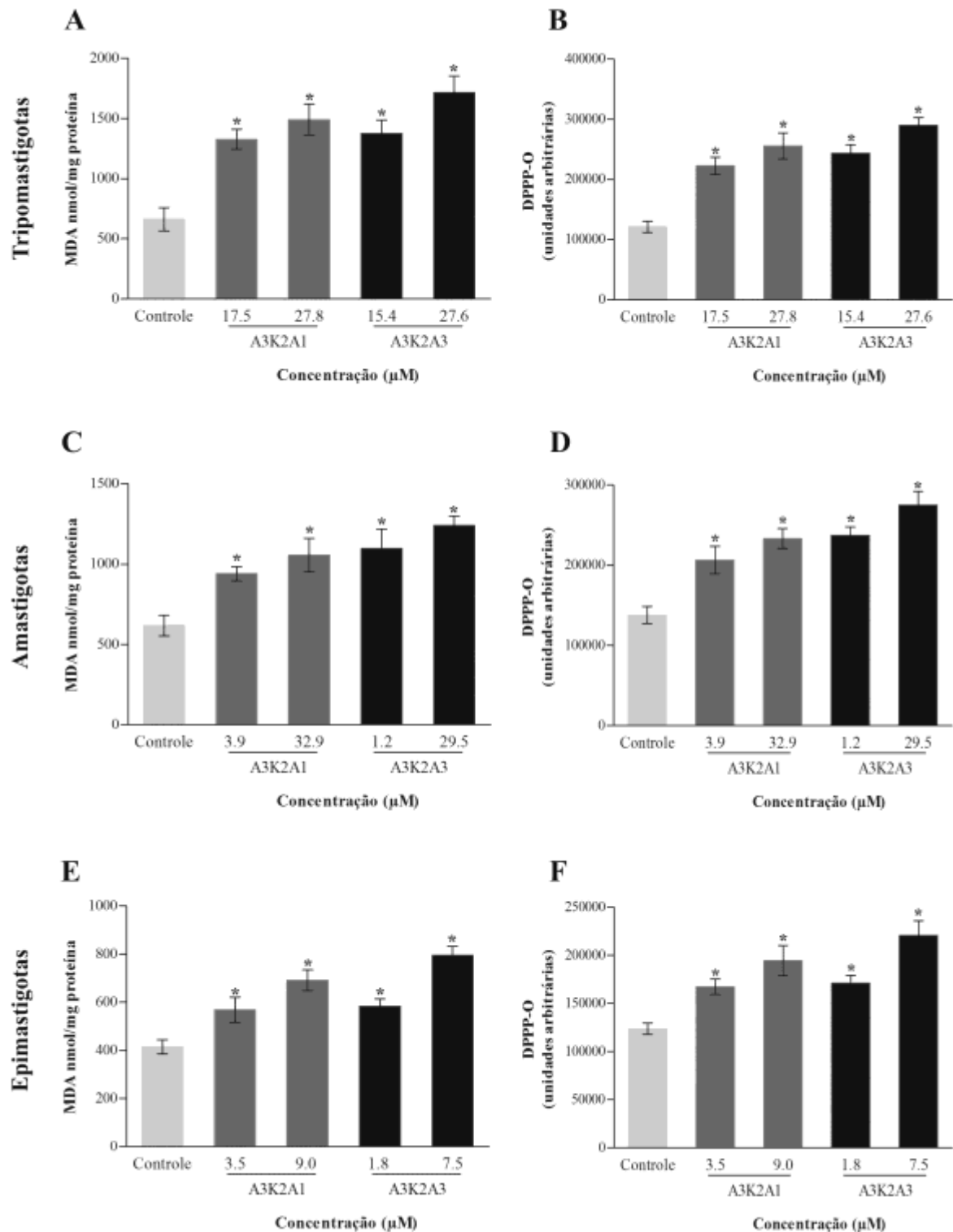


Figura 7. Determinação da peroxidação lipídica em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos, refletida pela quantidade de TBARS em termos de MDA (A,C,E) e usando o marcador DPPP (B,D,F). (A,B) Tripomastigotas. (C,D) Amastigotas. (E,F) Epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.7 A3K2A1 e A3K2A3 causam ruptura da membrana celular de *Trypanosoma cruzi*

Peroxidação lipídica é uma das principais causas do comprometimento da membrana celular (AYALA et al., 2014). Assim, nós também avaliamos a integridade da membrana celular em parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** usando IP por citometria de fluxo. **A3K2A1** e **A3K2A3**, em ambas as concentrações, alteraram significativamente a integridade da membrana celular em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* quando comparado com o grupo controle (Fig. 8). Os histogramas mostram um aumento na intensidade de fluorescência de IP em tripomastigotas (aproximadamente 50% para **A3K2A1** e 70% para **A3K2A3**), indicando ruptura da membrana celular. Em amastigotas, o aumento de células IP-positivas foi aproximadamente de 40% para **A3K2A1** e 50% para **A3K2A3**. Em epimastigotas, o aumento de células IP-positivas foi menor (aproximadamente 20%) para ambos os compostos. O controle positivo, digitonina, aumentou a fluorescência em 92,4%, 44,6% e 29,2% em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Estes dados confirmam nossos resultados de peroxidação lipídica.

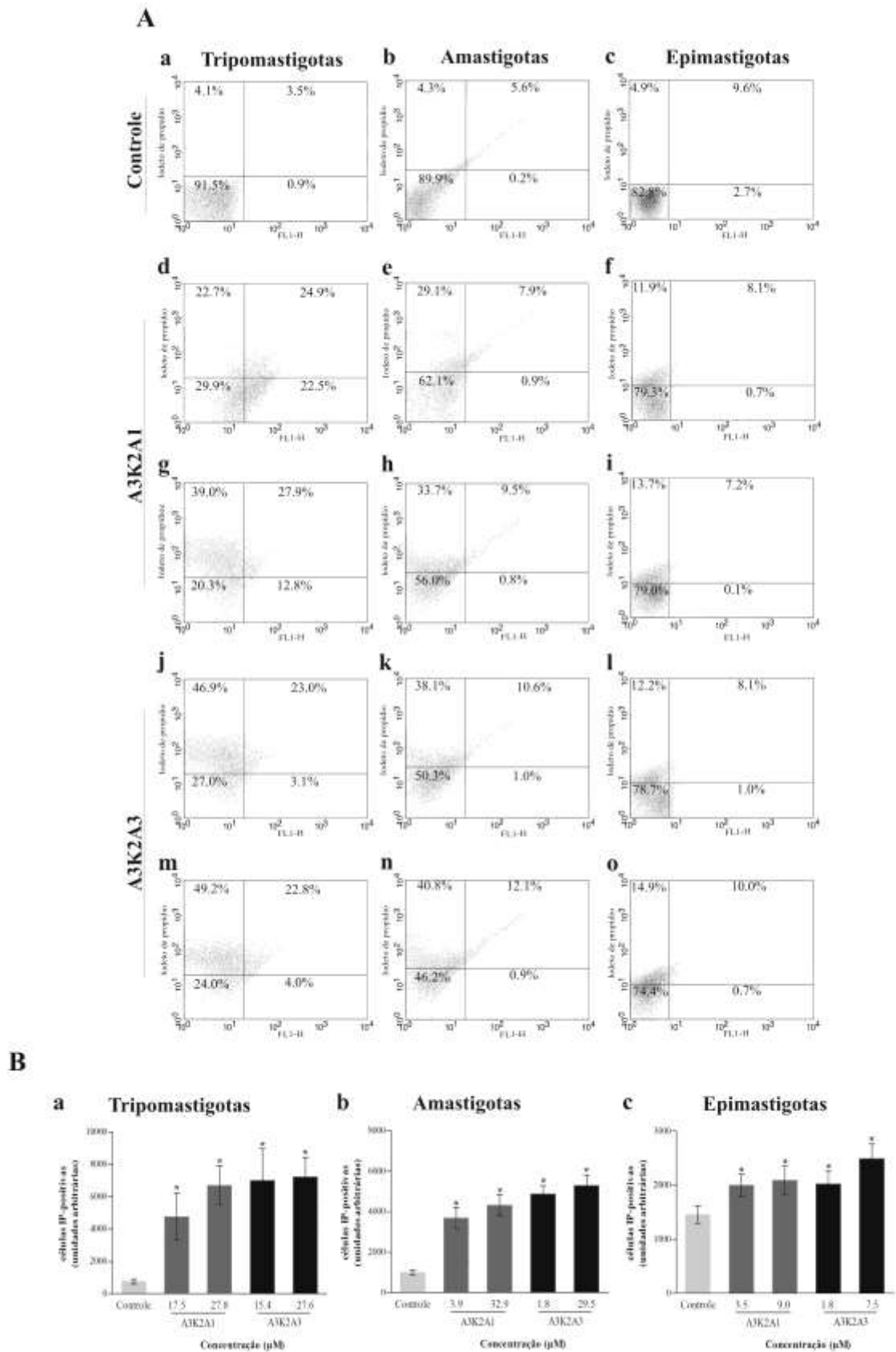


Figura 8. Determinação por citometria de fluxo da integridade da membrana celular em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com A3K2A1 ou A3K2A3 por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador IP. (A) Histogramas

típicos: (a) tripomastigotas não tratadas, (d,g) tripomastigotas tratadas com 17,5 e 27,8 μM de **A3K2A1**, (j,m) tripomastigotas tratadas com 15,4 e 27,6 μM de **A3K2A3**, (b) amastigotas não tratadas, (e,h) amastigotas tratadas com 3,9 e 32,9 μM de **A3K2A1**, (k,n) amastigotas tratadas com 1,2 e 29,5 μM de **A3K2A3**, (c) epimastigotas não tratadas, (f,i) epimastigotas tratadas com 3,5 e 9,0 μM de **A3K2A1**, (l,o) epimastigotas tratadas com 1,8 e 7,5 μM de **A3K2A3**. Porcentagens de células IP-positivas são mostradas nos quadrantes superiores direito e esquerdo. (B) Células IP-positivas em: (a) tripomastigotas, (b) amastigotas e (c) epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.8 **A3K2A1 e A3K2A3 aumentam corpos lipídicos em *Trypanosoma cruzi***

Ruptura mitocondrial e estresse celular aumentam significativamente a formação de corpos lipídicos (BOREN e BRINDLE, 2012; LEE et al., 2013). Baseado nos nossos experimentos anteriores, nós avaliamos se **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem a formação de corpos lipídicos em *T. cruzi* usando o marcador vermelho do Nilo por microscopia de fluorescência e fluorimetria. Figura 9 mostra aumentos em corpos lipídicos em parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3**. Este aumento foi significativo e mais pronunciado em amastigotas (até 2,3 e 2,8 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 9B), seguido por tripomastigotas (até 0,7 e 1,6 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**; Fig. 9A) e epimastigotas (até 0,4 e 0,9 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**; Fig. 9C), quando comparado com o grupo controle. Estes dados mostram que **A3K2A1** e **A3K2A3** comprometem a homeostase do parasito.

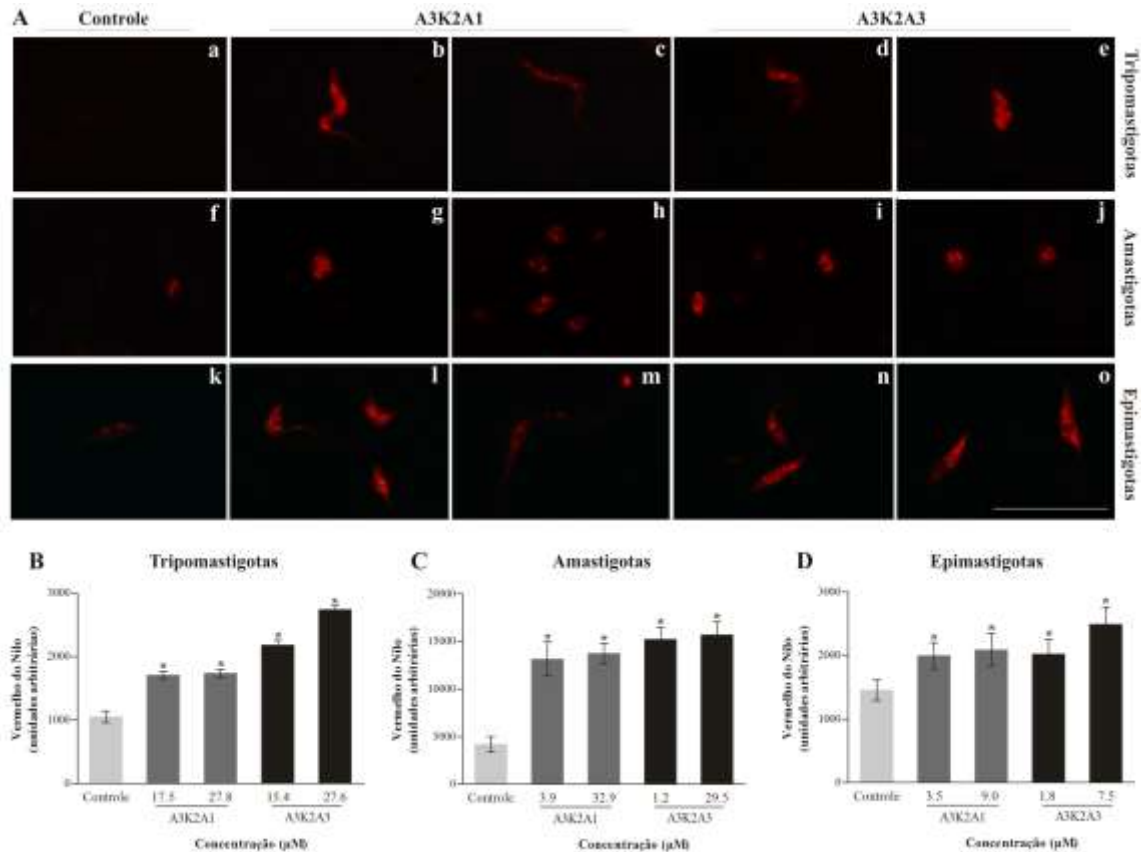


Figura 9. Determinação por microscopia de fluorescência e fluorimetria de corpos lipídicos em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador vermelho do Nilo. (A) Imagens de microscopia de fluorescência: (a) tripomastigotas não tratadas, (b,c) tripomastigotas tratadas com 17,5 e 27,8 μM de **A3K2A1**, (d,e) tripomastigotas tratadas com 15,4 e 27,6 μM de **A3K2A3**, (f) amastigotas não tratadas, (g,h) amastigotas tratadas com 3,9 e 32,9 μM de **A3K2A1**, (i,j) amastigotas tratadas com 1,2 e 29,5 μM de **A3K2A3**, (k) epimastigotas não tratadas, (l,m) epimastigotas tratadas com 3,5 e 9,0 μM de **A3K2A1**, (n,o) epimastigotas tratadas com 1,8 e 7,5 μM de **A3K2A3**. Barra de escala: 20 μm. Intensidade de fluorescência obtida por fluorimetria em: (B) Tripomastigotas. (C) Amastigotas. (D) Epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.9 A3K2A1 e A3K2A3 induzem exposição de fosfatidilserina em *Trypanosoma cruzi*

Os experimentos anteriores mostraram que **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem alterações vitais em *T. cruzi* que podem culminar na morte do parasito. Estas alterações perturbam a mitocôndria de *T. cruzi*, que desempenham um papel fundamental na ativação da apoptose (GREEN e REED, 1998). Além disso, o acúmulo de corpos lipídicos descritos acima é também uma característica da apoptose (BOREN e BRINDLE, 2012). Assim, nós exploramos

os efeitos de **A3K2A1** e **A3K2A3** sobre a exposição de fosfatidilserina, um fosfolípido que se expõe na superfície de células que sofrem apoptose (KROEMER et al., 2009), usando o marcador Annexina-V FITC por citometria de fluxo. Figura 10 mostra que parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** exibiram um aumento significativo na intensidade de fluorescência de Annexina-V, indicando exposição de fosfatidilserina, quando comparado com o grupo controle, com exceção de epimastigotas que foram tratadas com 3,5 μ M de **A3K2A1**. A exposição de fosfatidilserina foi mais pronunciada em tripomastigotas (aproximadamente 50% para **A3K2A1** e 55% para **A3K2A3**; Fig. 10A). Em amastigotas, a intensidade de fluorescência foi aproximadamente 40% para ambos os compostos (Fig. 10B). Em epimastigotas, a intensidade de fluorescência aumentou até 31% e 44% para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente (Fig. 10C). O controle positivo, actinomicina D, aumentou a exposição de fosfatidilserina em 32%, 28% e 8% em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Estes resultados mostram que **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem apoptose em *T. cruzi*.

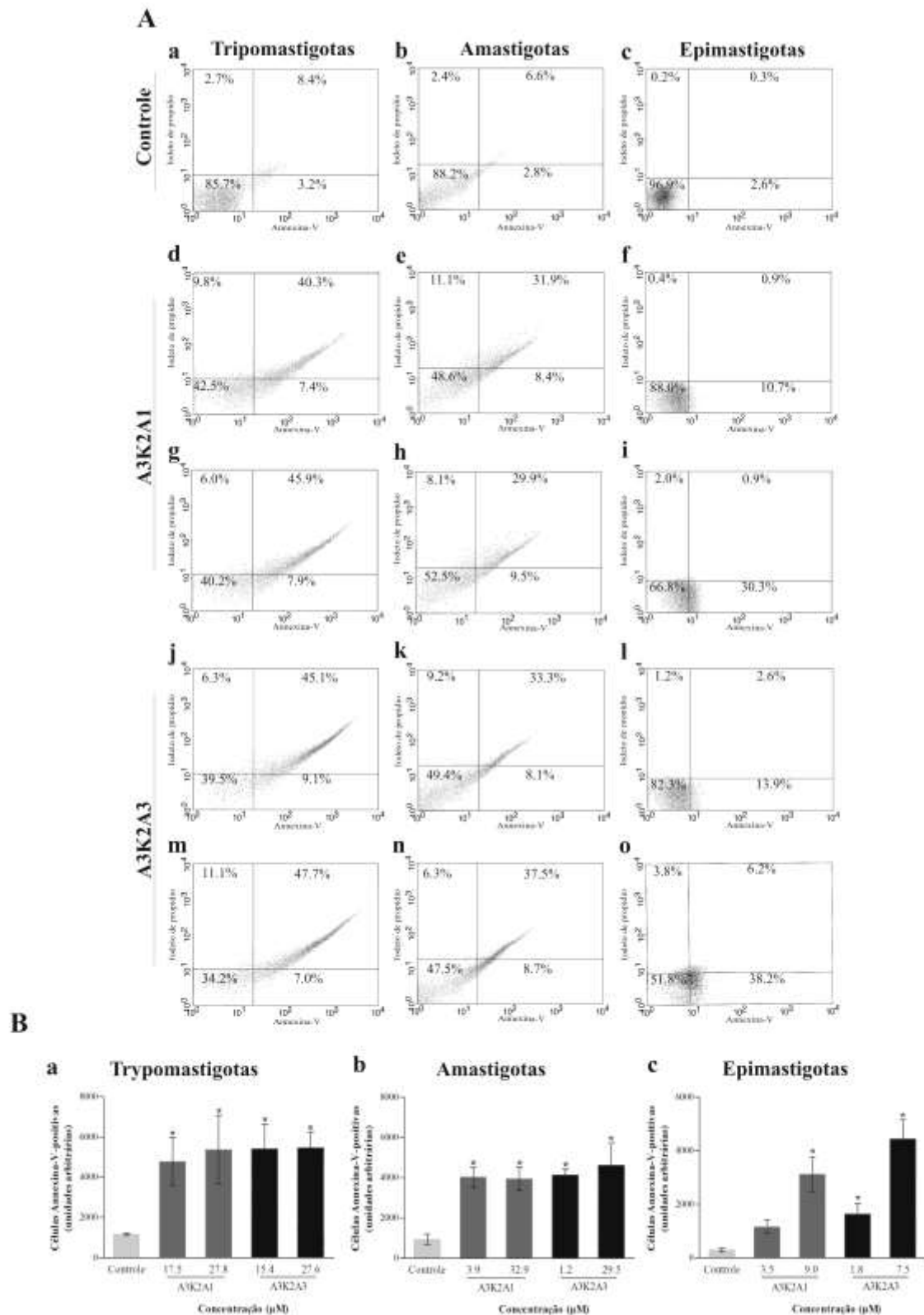


Figura 10. Determinação por citometria de fluxo da exposição de fosfatidilserina em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador Annexina-V FITC e IP. (A) Histogramas típicos: (a) tripomastigotas não tratadas, (d,g) tripomastigotas tratadas com 17,5 e 27,8 µM de **A3K2A1**, (j,m) tripomastigotas tratadas com 15,4 e 27,6 µM de **A3K2A3**, (b) amastigotas não tratadas, (e,h) amastigotas tratadas com 3,9 e 32,9 µM de

A3K2A1, (k,n) amastigotas tratadas com 1,2 e 29,5 μM de **A3K2A3**, (c) epimastigotas não tratadas, (f,i) epimastigotas tratadas com 3,5 e 9,0 μM de **A3K2A1**, (l,o) epimastigotas tratadas com 1,8 e 7,5 μM de **A3K2A3**. Porcentagens de células Annexina-V-positivas são mostradas nos quadrantes superior e inferior direito. (B) Células Annexina-V-positivas em: (a) tripomastigotas, (b) amastigotas e (c) epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.10 **A3K2A1 e A3K2A3 interrompem o ciclo celular na fase sub-G0/G1 em *Trypanosoma cruzi***

Altos níveis de EROs/ERNs podem induzir dano no DNA, o que pode levar a interrupção do ciclo celular seguido por apoptose (FULDA et al., 2010). Baseado nos nossos dados acima, nós avaliamos os efeitos de **A3K2A1** e **A3K2A3** sobre o ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi* por citometria de fluxo após a permeabilização celular e marcação com IP. Os resultados mostraram que epimastigotas tratadas com **A3K2A1** e **A3K2A3** exibiram um aumento significativo na população de células sub-G0/G1 (células que sofrem fragmentação da cromatina nuclear por DNAses, uma característica típica da apoptose) (KACZANOWSKI et al., 2011), quando comparado com o grupo controle. O aumento na população de células sub-G0/G1 foi de aproximadamente 40% para **A3K2A1** e 55% para **A3K2A3**; Fig. 11). Em contraste, o aumento na população de células sub-G0/G1 levou uma diminuição significativa na fase G2/M (duplicação do DNA) em epimastigotas tratadas com **A3K2A1** e **A3K2A3** comparado com o grupo controle. Estes resultados também indicam que **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem apoptose em *T. cruzi*.

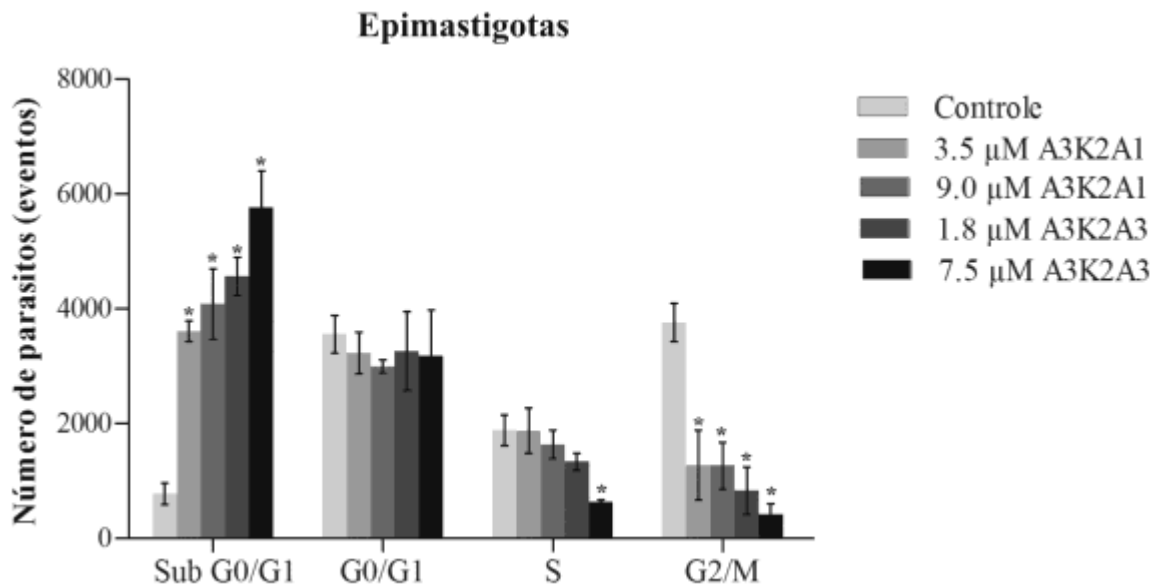


Figura 11. Determinação por citometria de fluxo do ciclo celular em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.11 A3K2A1 e A3K2A3 diminuem o volume celular de *Trypanosoma cruzi*

Além de alterações bioquímicas, apoptose também induz alterações morfológicas. Assim, nós realizamos experimentos adicionais para avaliar a diminuição do volume celular, que é uma característica da morte por apoptose, em parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3** por citometria de fluxo (KROEMER et al., 2009). Figura 12 mostra uma diminuição significativa no volume celular em todas as concentrações testadas de ambos os compostos nas três formas parasitárias quando comparado com o grupo controle. A diminuição do volume celular foi mais pronunciada em tripomastigotas (até 81% e 95% para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 12A) do que em amastigotas (até 75% e 83%; Fig. 12B) e epimastigotas (até 47% e 46%; Fig. 12C). O controle positivo, actinomicina D, também diminuiu o volume celular em 39%, 69% e 28% em tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, respectivamente. Estes dados confirmam que **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem alterações em *T. cruzi* que parecem refletir a apoptose.

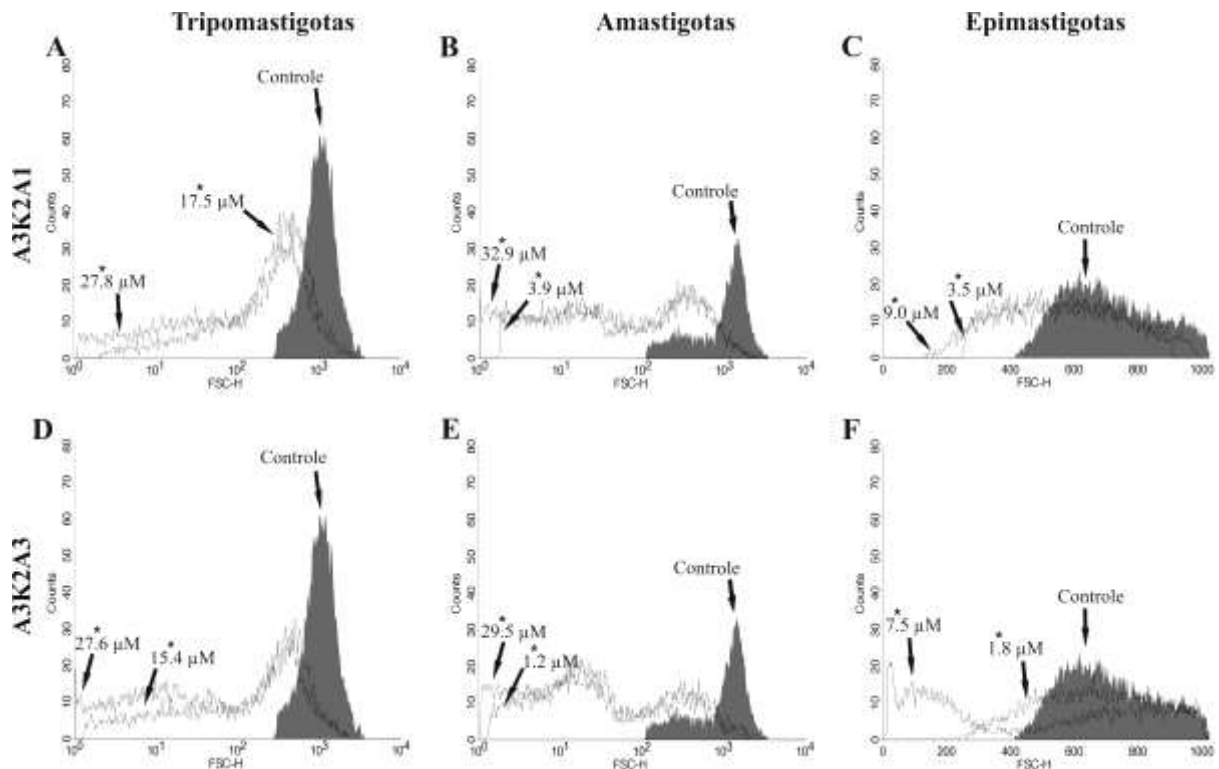


Figura 12. Determinação por citometria de fluxo do volume celular em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A3K2A1** ou **A3K2A3** por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos. (A,D) Tripomastigotas. (B,E) Amastigotas. (C,F) Epimastigotas. Setas correspondem às concentrações testadas. Grupo controle (parasitos não tratados) também é mostrado. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0.05$).

5.12 **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem a formação de vacúolos autofágicos em *Trypanosoma cruzi*

Aumentos dos níveis de EROs celulares estão associados com o início da autofagia (FILOMENI et al., 2014). Portanto, nós avaliamos se a autofagia também pode ser um tipo de morte celular induzida por **A3K2A1** e **A3K2A3** usando o marcador MDC por microscopia de fluorescência. Figura 13 mostra a presença de fluorescência em estruturas arredondadas em parasitos tratados com **A3K2A1** e **A3K2A3**, indicando a formação de vacúolos autofágicos. Este efeito foi parcialmente evitado pelo pré-tratamento com wortmanina. Este aumento na formação de vacúolos autofágicos foi significativo e mais acentuado em amastigotas (até 1,0 e 1,3 vezes para **A3K2A1** e **A3K2A3**, respectivamente; Fig. 13B) e tripomastigotas (até 1,0 e 1,2 vezes; Fig. 13A) do que para epimastigotas (até 0,8 e 0,9 vezes; Fig. 13C). Assim, **A3K2A1** e **A3K2A3** pode também causar a morte autofágica em *T. cruzi*.

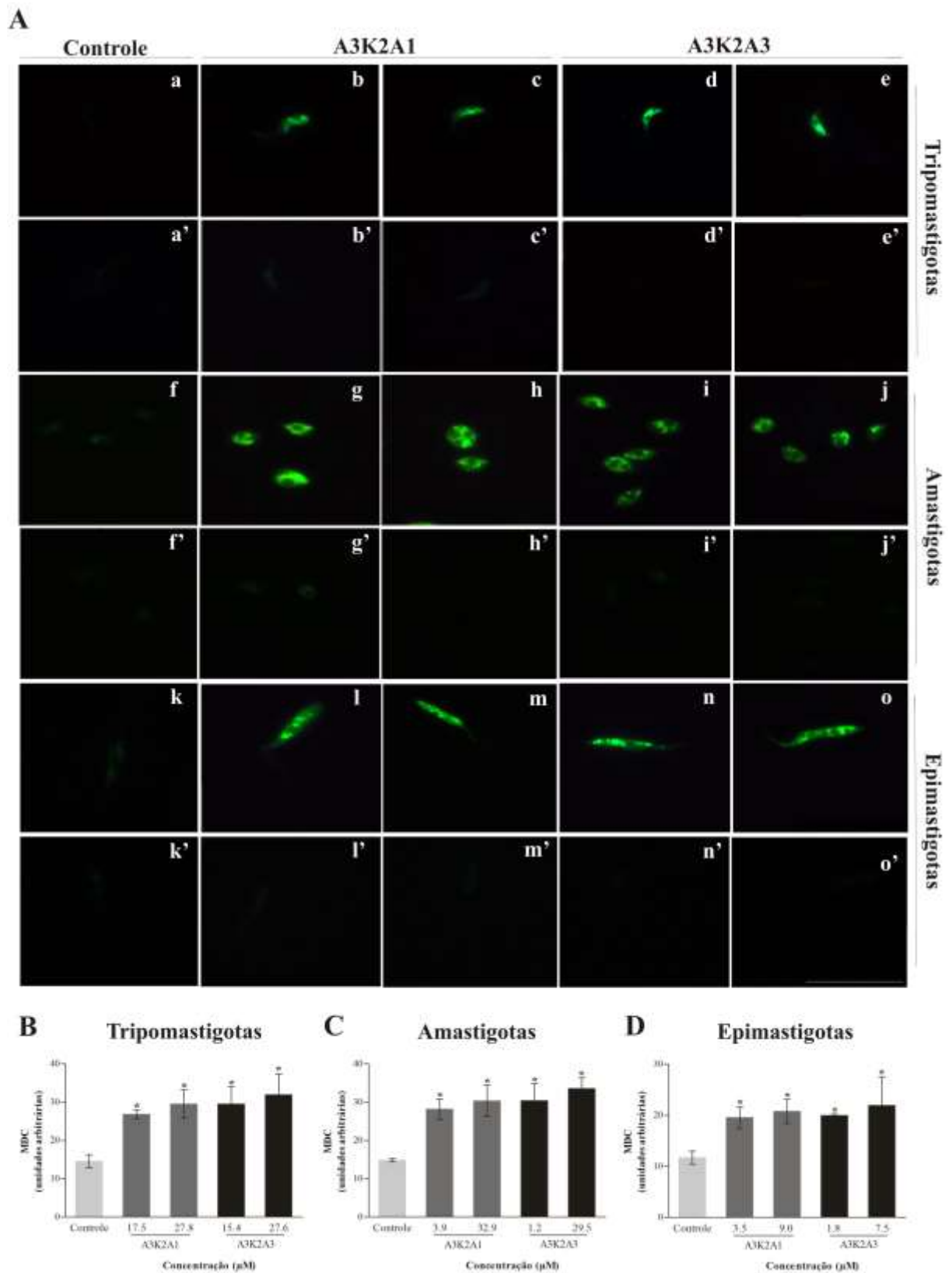


Figura 13. Determinação por microscopia de fluorescência de vacúolos autofágicos em formas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* tratadas com A3K2A1 ou A3K2A3 por 24 h com concentrações que inibiram 50% e 90% dos parasitos usando o marcador MDC. (A) Imagens de microscopia de fluorescência: (a,a') tripomastigotas não tratadas, (b,c) tripomastigotas tratadas com 17,5 e 27,8 µM de A3K2A1, (b',c') tripomastigotas tratadas com 17,5 e 27,8

μM de **A3K2A1** + 0,5 μM de wortmanina, (d,e) tripomastigotas tratadas com 15,4 e 27,6 μM de **A3K2A3**, (d',e') tripomastigotas tratadas com 15,4 e 27,6 μM de **A3K2A3** + 0,5 μM de wortmanina, (f,f') amastigotas não tratadas, (g,h) amastigotas tratadas com 3,9 e 32,9 μM de **A3K2A1**, (g',h') amastigotas tratadas com 3,9 e 32,9 μM de **A3K2A1** + 0,5 μM de wortmanina, (i,j) amastigotas tratadas com 1,2 e 29,5 μM de **A3K2A3**, (i',j') amastigotas tratadas com 1,2 e 29,5 μM de **A3K2A3** + 0,5 μM de wortmanina, (k,k') epimastigotas não tratadas, (l,m) epimastigotas tratadas com 3,5 e 9,0 μM de **A3K2A1**, (l',m') epimastigotas tratadas com 3,5 e 9,0 μM de **A3K2A1** + 0,5 μM de wortmanina, (n,o) epimastigotas tratadas com 1,8 e 7,5 μM de **A3K2A3**, (n',o') epimastigotas tratadas com 1,8 e 7,5 μM de **A3K2A3** + 0,5 μM de wortmanina. Barra de escala: 20 μm . Intensidade de fluorescência obtida por ImageJ em: (B) Tripomastigotas. (C) Amastigotas. (D) Epimastigotas. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (parasitos não tratados; $p \leq 0.05$).

5.13 **A3K2A1 e A3K2A3 reduzem a parasitemia em modelo murino de infecção aguda da doença de Chagas**

Baseado em nossos resultados promissores obtidos *in vitro*, nós avaliamos *in vivo* o efeito de **A3K2A1** e **A3K2A3**, sozinhos ou em combinação com o fármaco de referência benznidazol, em modelo murino de infecção aguda da doença de Chagas. Figura 14 mostra que **A3K2A1** e **A3K2A3**, sozinhos ou em combinação com benznidazol, reduziram os níveis de parasitemia comparado com o grupo infectado e não tratado. A administração de **A3K2A1** sozinho (5mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia) (Fig. 14a1 e 14a2) e em combinação com benznidazol (5mg/kg/dia de cada) (Fig. 14a3) reduziu significativamente os níveis de parasitemia nos 8, 9, 13 e 14° dpi. Esta redução no pico parasitemico (8° dpi) foi de 49%, 78% e 77% para o tratamento com **A3K2A1** sozinho em ambas as concentrações testadas e em combinação com benznidazol, respectivamente. A administração de **A3K2A3** (5mg/kg/dia) (Fig. 14b1) e **A3K2A3** (100mg/kg/dia) (Fig. 14b2) também induziu diminuição significativa na parasitemia nos 8, 9, 10, 13 e 14° dpi com uma redução no pico parasitemico em torno de 79%. A associação de **A3K2A3** com benznidazol (5mg/kg/dia de cada) (Fig. 14b3) apresentou reduções significativas nos 7, 8, 9, 10, 13 e 14° dpi, sendo a redução no pico parasitemico de 76%. O tratamento com benznidazol (5mg/kg/dia) mostrou diferenças significativas nos 8, 13 e 14° dpi, com redução no pico parasitemico de 44%, enquanto que o tratamento com 100 mg/kg/dia, as reduções foram significativas nos 7, 8, 9, 10, 13 e 14° dpi, com redução de 100% na parasitemia.

Ao final do 21° dpi, o grupo infectado e não tratado apresentou uma taxa de sobrevivência de 20%, enquanto que o grupo tratado com **A3K2A1** (100 mg/kg/dia) apresentou 80% de sobrevivência. Ainda, o grupo tratado com a associação de **A3K2A1** e

benznidazol apresentou 40% de sobrevivência (Fig. 15A). Em relação ao tratamento com **A3K2A3**, apenas o grupo tratado com 5 mg/kg/dia apresentou sobrevivência (40%) (Fig. 15B).

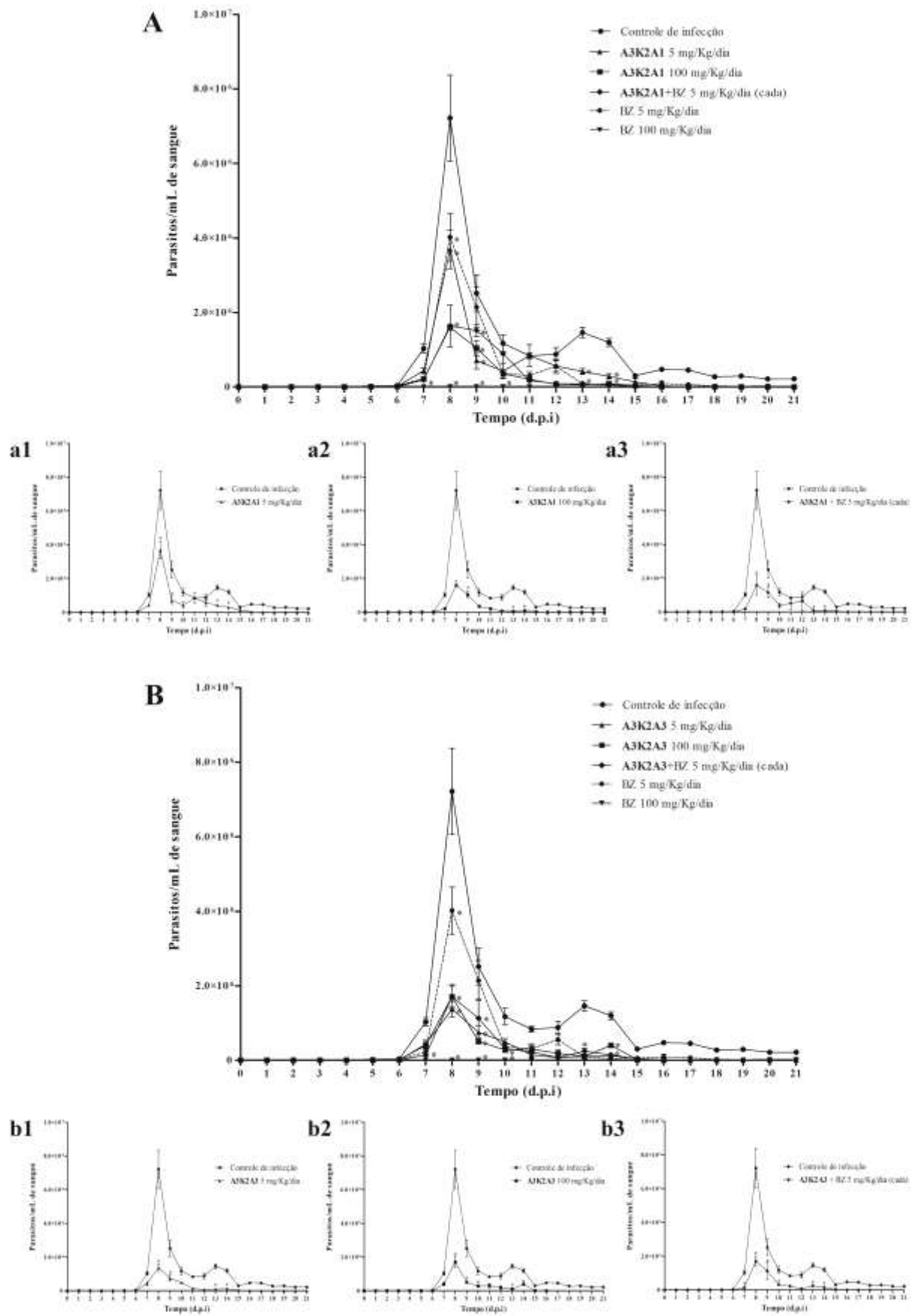


Figura 14. Efeitos de **A3K2A1**, **A3K2A3** e BZ sobre a parasitemia em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas. (A) **A3K2A1** e BZ, sozinhos ou combinados: (a1) **A3K2A1** (5mg/kg/dia), (a2) **A3K2A1** (100mg/kg/dia), (a3) **A3K2A1** + BZ (5mg/kg/dia - cada). (B) **A3K2A3** e BZ, sozinhos ou combinados: (b1) **A3K2A3** (5mg/kg/dia), (b2) **A3K2A3** (100mg/kg/dia), (b3) **A3K2A3** + BZ (5mg/kg/dia - cada). Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0.05$).

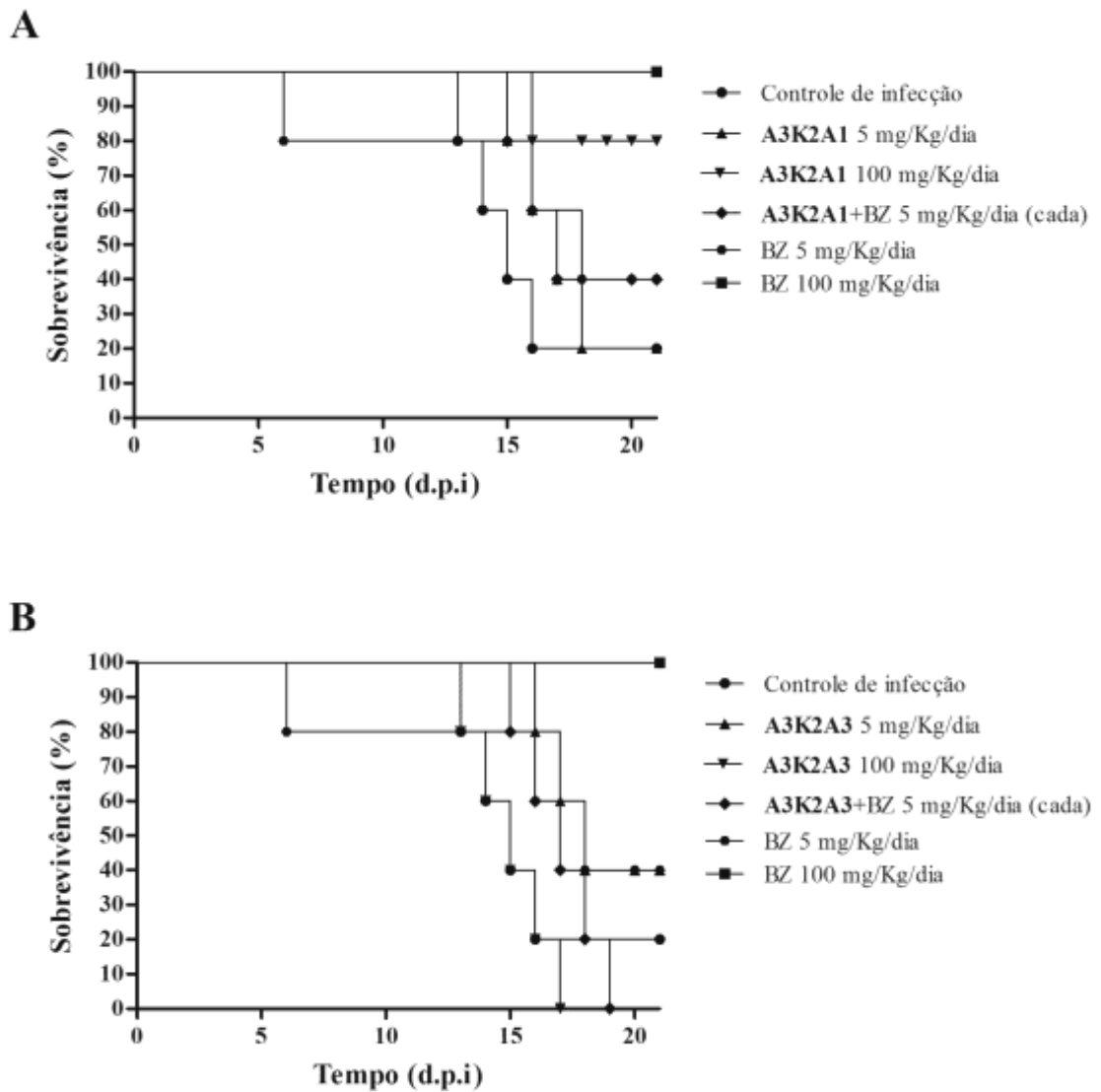


Figura 15. Efeitos de **A3K2A1**, **A3K2A3** e BZ sobre a taxa de sobrevivência em modelo murino da infecção aguda da doença de Chagas. (A) **A3K2A1** e BZ, sozinhos ou combinados. (B) **A3K2A3** e BZ, sozinhos ou combinados. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0.05$).

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido realizados ao longo dos últimos 100 anos para se descobrir novos agentes tripanocidas (VALDEZ et al., 2009; IZUMI et al., 2011). No entanto, nenhum substituto foi ainda desenvolvido para os nitrocompostos benznidazol e nifurtimox. O desenvolvimento de novas moléculas sintéticas com grupos funcionais semelhantes aos dois fármacos de referência é necessário para minimizar a toxicidade e assegurar a eficácia contra *T. cruzi* (IRIGOÍN et al., 2008; BOIANI et al., 2009). Em um estudo anterior, as DBAs **A3K2A1** e **A3K2A3**, caracterizadas por um ou mais grupos nitros ligados diretamente ao anel aromático, mostraram atividade seletiva contra *T. cruzi* (UD DIN et al., 2014). O presente estudo buscou elucidar o mecanismo de ação *in vitro* e os efeitos biológicos *in vivo* induzidos por **A3K2A1** e **A3K2A3** na morte celular deste protozoário.

A literatura descreve que a bioatividade de nitrocompostos está relacionada com a redução do grupo nitro para formar espécies reativas (PATTERSON e WYLLIE, 2014). **A3K2A1** e **A3K2A3** são nitrocompostos, e a capacidade deles em formar espécies reativas foi confirmada neste estudo através do aumento da produção de EROs/ERNS. Adicionalmente, **A3K2A1** e **A3K2A3** induzem uma diminuição dos níveis de tióis reduzidos nas três formas parasitárias do parasito. Tiol é o principal grupo da TR, uma enzima fundamental para o sistema único tiol-redox que atua em tripanosomatídeos. Nestes parasitos, a regeneração enzimática do *pool* de tiol parece depender da TR. Semelhante ao sistema glutaciona, que é encontrado nos hospedeiros mamíferos, o sistema tripanotiona protege o parasito dos danos oxidativos (IRIGOÍN et al., 2008). Interessantemente, nós verificamos que tripomastigotas (forma infectiva da corrente sanguínea no hospedeiro mamífero) foram as mais susceptíveis à ação destes compostos. Tripomastigota é a forma de *T. cruzi* com níveis mais elevados de tripanotiona no sistema tiol-redox, o que nos levou a pensar que **A3K2A1** e **A3K2A3** são especialmente ativos contra o sistema antioxidante tripanotiona-dependente. Uma diminuição mais pronunciada nos níveis de tióis reduzidos já foi relatada anteriormente (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013).

Aumentos de espécies oxidantes induzem disfunção mitocondrial, que compromete a viabilidade celular (KANG e PERVAIZ, 2012). No presente estudo, marcação com Rh123 revelou reduções acentuadas do $\Delta\Psi_m$, especialmente em tripomastigotas. Tripomastigotas exibem reduções do $\Delta\Psi_m$ com um resultado da remodelação durante o ciclo de vida de *T. cruzi* (GONÇALVES et al., 2011). Diversos estudos de compostos tripanocidas que têm como

alvo a mitocôndria de *T. cruzi* têm sido publicados (MENNA-BARRETO et al., 2009; CALEARE et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013). É importante ressaltar que *T. cruzi* possui uma única mitocôndria que ocupa 12% do volume total do parasito (FIDALGO e GILLE, 2011).

Aumentos de espécies reativas podem danificar estruturas celulares, incluindo lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (ALI et al., 2012; BIRBEN et al., 2012). Nós observamos que as três formas parasitárias de *T. cruzi* tratadas com **A3K2A1** e **A3K2A3** exibiram danos em macromoléculas essenciais, refletidas pela peroxidação lipídica nos ensaios de MDA e DPPP. Como um resultado da peroxidação lipídica, distúrbios na integridade da membrana celular foram também demonstrados através da marcação com IP. Peroxidação lipídica é um processo que afeta a integridade estrutural e funcional das membranas celulares, levando ao rearranjo estrutural da membrana e induzindo alterações na sua permeabilidade (PAMPLONA, 2008). Nós também observamos que **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram fragmentação do DNA em epimastigotas de *T. cruzi*, refletido por um aumento da população de células na fase sub-G0/G1. A fragmentação do DNA pode perturbar o mecanismo responsável pela duplicação das células, levando a interrupção do ciclo celular. As alterações em *T. cruzi* que foram induzidas por **A3K2A1** e **A3K2A3** também incluiu a formação de corpos lipídicos, uma característica de estresse celular que resulta da desregulação mitocondrial, revelada aqui pelo marcador vermelho do Nilo. A formação e o rápido acúmulo de corpos lipídicos é uma característica da morte celular por apoptose (BOREN e BRINDLE, 2012; LEE et al., 2013). Outros estudos têm relatado o aumento na formação de corpos lipídicos em tripanosomatídeos sob condições de estresse (DANTAS et al., 2003; STEFANELLO et al., 2014).

Todas as alterações morfológicas e bioquímicas que foram induzidas por **A3K2A1** e **A3K2A3** no presente estudo acarretaram em danos cumulativos através de uma cascata de eventos que são incompatíveis com a sobrevivência da célula. Nós observamos que **A3K2A1** e **A3K2A3** pode induzir a morte do parasito através de vias diferentes. Nós acreditamos que apoptose (refletida aqui por despolarização mitocondrial, fragmentação do DNA, acúmulo de corpos lipídicos exposição de fosfatidilserina e redução do volume celular) pode ser o mecanismo preferencial de morte celular. Baseado na presença de vacúolos autofágicos, revelado pela marcação com MDC, a autofagia pode também ser um tipo de morte celular. Ambas as vias de morte celular (apoptose e autofagia) têm sido bem descritas em tripanosomatídeos, com significativa participação da mitocôndria e EROs (MENNA-BARRETO et al., 2009; SMIRLIS et al., 2010). Evidências sugerem que o evento chave na

transição de apoptose para autofagia é a produção excessiva de espécies oxidantes (ADDABBO et al., 2009; KAMINSKY e ZHIVOTOVSKY, 2014).

Neste contexto, uma questão é se o aumento de espécies oxidantes induzidas por **A3K2A1** e **A3K2A3** é uma causa ou uma consequência da disfunção mitocondrial. Disfunção mitocondrial pode levar a um aumento de EROs/ERNs e, inversamente, um aumento de EROs/ERNs pode induzir disfunção mitocondrial, o que torna a relação entre eles recíproca (VAMECQ et al., 2012). Baseado nos nossos resultados, a nossa hipótese geral é que o mecanismo de ação de **A3K2A1** e **A3K2A3** envolve um aumento da produção de EROs/ERNs, seguido da disfunção mitocondrial. Esta hipótese baseia-se no aumento precoce de $O_2^{\cdot-}$ (após 3 h de tratamento) comparado com a diminuição tardia do $\Delta\Psi_m$ (após 24 h de tratamento). A quantidade excessiva de espécies oxidantes pode atuar sobre qualquer membrana, incluindo a membrana mitocondrial, o que pode comprometer ainda mais a função mitocondrial e induzir mais produção de EROs/ERNs (RHOADS et al., 2006; GUPTA et al., 2009). Além disso, a quantidade em excesso de espécies reativas pode induzir a depleção do sistema antioxidante endógeno (demonstrado aqui por uma diminuição dos níveis de tióis reduzidos após 48 h de tratamento), o que agrava ainda mais a condição de estresse oxidativo (MAHMOOD et al., 2009). Esta possibilidade é também suportada pelas estruturas químicas de **A3K2A1** e **A3K2A3**, que são nitrocompostos (PATTERSON e WYLLIE, 2014) (Fig. 16).

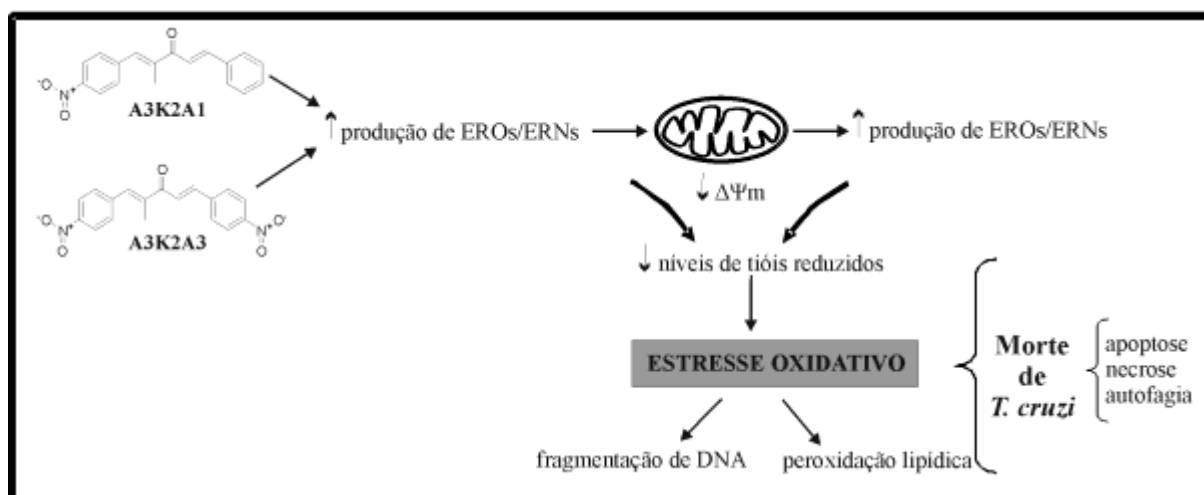


Figura 16. Mecanismo proposto da ação tripanocida de dibenzilidenoacetonas. **A3K2A1** e **A3K2A3** aumentam a produção de EROs/ERNs, que desencadeia despolarização mitocondrial (perda do $\Delta\Psi_m$), induzindo, portanto, maior produção de EROs/ERNs seguido pela diminuição dos níveis de tióis reduzidos. Esta condição de estresse oxidativo afeta todas as estruturas e funções das células, levando à morte do parasito.

Todos os efeitos que foram induzidos por **A3K2A1** e **A3K2A3** no presente estudo estão intimamente relacionados com sua relação estrutura-atividade. Vários estudos tem reportado a eficácia de compostos que possuem um ou mais grupos nitro contra muitas doenças (OLIVEIRA et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2010; BASTOS et al., 2014). Portanto, como esperado, **A3K2A3**, que contém dois grupos nitros em sua estrutura, tem melhor atividade do que **A3K2A1**, que contém apenas um grupo nitro.

Adicionalmente, **A3K2A1** e **A3K2A3** induziram redução significativa nos níveis de parasitemia e melhora na sobrevivência dos animais infectados por *T. cruzi*. Os grupos tratados com **A3K2A1** sozinho e combinado com benznidazol apresentaram os melhores resultados. É importante destacar que a baixa concentração de benznidazol utilizada em combinação com **A3K2A1** pode resultar em uma redução da toxicidade e melhora na eficácia terapêutica do benznidazol, inclusive na fase crônica da doença de Chagas. De fato, a terapia combinada oferece inúmeras vantagens, uma vez que os constituintes de uma combinação podem atuar sinergicamente ou em aditividade reduzindo a resistência, melhorando a eficácia do tratamento, reduzindo a dose e/ou a duração do tempo de tratamento, diminuindo os efeitos secundários e melhorando a adesão do paciente (URBINA, 2015). Por outro lado, o tratamento com **A3K2A3**, apesar de exibir maior redução na parasitemia em comparação com **A3K2A1**, não exibiu melhora na sobrevivência dos animais infectados e tratados com a maior concentração e quando associado com benznidazol. Essa maior toxicidade possivelmente se deve ao maior número de grupo nitro em sua estrutura, pois assim como **A3K2A3** mostrou-se mais ativo contra *T. cruzi*, esse grupo nitro pode resultar em maior toxicidade, uma vez que mais espécies reativas podem estar formando por este composto (PATTERSON e WYLLIE, 2014). Assim, apesar das propriedades biológicas interessantes mostradas por esses compostos, acreditamos que o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada poderia ser uma abordagem promissora para melhorar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais destes compostos na terapêutica da doença de Chagas.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que **A3K2A1** e **A3K2A3** são fortes ativadores da morte de *T. cruzi* por perturbar a homeostase do sistema redox. **A3K2A3** foi o composto mais ativo, que induziu a morte do parasito com alterações expressivas nos componentes maquinários de *T. cruzi* e suas funções. Tripomastigotas e amastigotas são formas infectivas de *T. cruzi* que estão presentes no hospedeiro mamífero, e foram as mais susceptíveis às ações destes nitrocompostos. Nossos resultados *in vivo* suportam novos estudos pré-clínicos com protocolos terapêuticos diferentes e utilizando sistemas de liberação modificada, com o objetivo de alcançar melhores resultados para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M., FIGUEIREDO, R. C., DE CASTRO, S. L. , SOARES, M. J. Effect of L-leucine methyl ester on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 101, p. 69-79, 2007.
- ADDABBO, F.; MONTAGNANI, M.; GOLIGORSKY, M. S. Mitochondria and reactive oxygen species. **Hypertension**, v.53, p. 885–892, 2009.
- AHER, R. B.; WANARE, G.; KAWATHEKAR, N.; KUMAR, R. R.; KAUSHIK, N. K.; SAHAL, D.; CHAUHAN, V. S. Dibenzylideneacetone analogues as novel *Plasmodium falciparum* inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 3034–3036, 2011.
- ALI, E. M. M.; HAMDY, S. M.; MOHAMED, T. M. Nitric Oxide Synthase and Oxidative Stress: Regulation of Nitric Oxide Synthase. In: LUSHCHAK, V. **Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects**. Intech; 2012.
- ANDRADE, S. G. Apoptose e sua importância no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 2, p. 163-173, 2003.
- ANTO, R. J.; SUKUMARAN, K.; KUTTAN, G.; RAO, M. N. A.; SUBBARAJU, V.; KUTTAN, R. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Letters**, v. 97, p. 33-37, 1995.
- APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5892–5902, 2004.
- ARAÚJO, A. C. C.; WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. **Vector-born and Zoonotic Diseases**, v. 9, 2009.
- ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, p. 189-198, 2001.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.
- BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- BASTOS, T. M.; BARBOSA, M. I. F.; SILVA, M. M.; JÚNIOR, J. W. C.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; ELLENA, J.; MOREIRA, D. R. M.; BATISTA, A. A.; SOARES, M. B. P. Nitro/nitrosyl ruthenium complexes are potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* agents causing autophagy and necrotic parasite death. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 6044-6055, 2014.

BHANDARKAR, S. S.; BROMBERG J.; CARRILLO, C.; SELVAKUMAR, P.; SHARMA, R. K.; PERRY, B. N.; GOVINDARAJAN B.; FRIED, L.; SOHN, A.; REDDY, K.; ARBISER, J. L. Tris (Dibenzylideneacetone) Dipalladium, a *N*-Myristoyltransferase-1 Inhibitor, Is Effective against Melanoma Grown *In vitro* and *In vivo*. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 5743-5748, 2008.

BIEDERBICK, A.; KERN, H. F.; ELSASSER, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. **European Journal of Cell Biology**, v. 66, p.3-14, 1995.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BITTENCOURT, A. L. Transmissão Vertical da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BLOMMAART, E. F.; KRAUSE, U.; SCHELLENS, J. P.; VREELING-SINDELÁROVÁ, H.; MEIJER, A. J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 240-246, 1997.

BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A. Mode of action of Nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1736-1745, 2010.

BOREN, J.; BRINDLE, K. M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell Death Differentiation**, v. 19, p. 1561-1570, 2012.

BOURGUIGNON, S. C.; CAVALCANTI, D. F. B.; SOUZA, A. M. T.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANTOS, O. D.; SILVA, G. G.; SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; PINHO, R. T.; ALVES, C. R. *Trypanosoma cruzi*: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 160-166, 2011

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z. In: Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. S. Wendel, Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi (Ed.). **International Society for Blood Transfusion**, 1992.

BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COPPENSC, I.; RIGDEND, D. J.; GINGERE, M. L.; MICHELS, P. A. M.; Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 177, p. 83-99, 2011.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; CERÁIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agentes: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, v. 3356-3367, 2007.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 222-230, 2000.

CALEARE, A. O.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone isolated from *Kielmeyera coriacea*. **Parasitology International**, v. 62, p. 405-411, 2013.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CAMPOS, V.; STRABELLI, T. M.; AMATO NETO, V.; SILVA, C. P.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; STOLF, N. A. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 27, p. 597-602, 2008.

CARLIER, Y. Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. **Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique**, v. 162, p. 409-416, 2007.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2;2, p. 1261-1271, 2002.

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

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527-605, 1979.

COURA, J. R. Oríem, determinants e morbidade da Doença de Chagas. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud**. Universidad de Carabobo, v. 1, p. 62-66, 2007.

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

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, p. 5-13, 2010.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 508–512, 2005.

DANTAS, A. P.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 35, p. 287–294, 2003.

DE SOUZA, E. M.; NEFERTITI, A. S. G.; BAILLY, C.; LANSIAUX, A.; SOEIRO, M. N. C. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 341, p. 173–180, 2010.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, v. 86, p. 197–283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89–100, 2009.

DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DIAS, J. C. P. – The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 772–774, 2006.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375–379, 2011.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G. O.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The metabolism and mode of action of gentian violet. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 2–3, p. 161–178, 1990.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitology Today**, v. 11, p. 443–448, 1999.

DUMAS, C.; OUELLETTE, M.; TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; TAMAR, S.; OLIVER, M.; PAPADOPOULOU, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **Embo Journal**, v. 16, p. 2590–2598, 1997.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 2, p. 19-51, 2007.

FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; BARRETO-JUNIOR, C. B.; NASCIMENTO, M. T.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DELORENZI, J. C.; LIMA, M. E.; ATELLA, G. C.; FOLLY, E.; CARVALHO, T. M.; SARAIVA, E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2155–2164, 2011.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 5, p. 507-509. 2006.

FESTJENS, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 1371-1387, 2006.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

FILOMENI, G.; ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-23, 2010.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, p. 3-12, 2010.

GONÇALVES, R. L. S.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; POLYCARPO, C. R.; GADELHA, F. R.; CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. F. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 651-661, 2011.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998

GUEDES, P. M. M.; GUTIERREZ, F. R. S.; NASCIMENTO, M. S. L.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; SILVA, J. S. Antiparasitical chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, p. 1057-1065, 2012.

GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J. J.; WU, Y., HUANG, M. H.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 1414-1421, 2009.

GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 29-32, 2003.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-668, 2001.

HORIKAWA, M. M.; PEÑA, M. S. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para um infecção bem sucedida. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 32-37, 2011.

IANNI, B. M.; MADY, C. Como era gostoso o meu caldo de cana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 6, p. 379-381, 2005.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.A.; WILKINSON, S. R.; FLOHE, L.; RADY, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p.733-742, 2008.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plants compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 809-823, 2011.

JIMENEZ, V.; PAREDES, R.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, p. 688–698, 2008.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasite & Vectors**, v. 3, n. 104, p. 1-15, 2010.

JOSHI, D. C.; BAKOWSKA, J. C. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. **Journal of Visualized Experiments**, v. 51, 1-4, 2011

KACZANOWSKI, S.; MOHAMMED, S.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-8, 2011.

KAMINSKY, V. O.; ZHIVOTOVSKY, B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, p. 86-102, 2014.

KANG, J.; PERVAIZ, S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. **Biochemistry Research International**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 449–457, 2001.

KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY B.; MELINO, G. Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LAHTCHEV, K. L.; BATOVSKA, D. I.; PARUSHEV, S. P.; UBIYVOVK, V. M.; SIBIRNY, A. A. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2220-2228, 2008.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, S. O. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 60, p.17-28, 2013.

LEE, H. E.; CHOI, E. S.; JUNG, J. Y.; YOU, M. J.; KIM, L. H.; CHO, S. D. Inhibition of specificity protein 1 by dibenzylideneacetone, a curcumin analogue, induces apoptosis in mucoepidermoid carcinomas and tumor xenografts through Bim and truncated Bid. **Oral Oncology**, v. 50, p. 189-195, 2014.

LEE, S. J.; ZHANG, J.; CHOI, A. M. K.; KIM, H. P. Mitochondrial dysfunction induces formation lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O.; RUSSOMANDO, G.; ALMIRON, M.; GUILLEN, I.; GANZÁLEZ CAPPÀ, S. M., FRASCH, A. C. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infectious. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 6, p. 1570-1574, 1994.

LIESE, B. H.; SCHUBERT, L. Official development assistance for health – how neglected are neglected tropical diseases? An analysis of health financing. **International Health**, v. 1, p. 141-147, 2009.

MAHMOOD, K. A. S.; AHMED, J. H.; JAWAD, A. M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), free radicals and reactive oxygen species (ROS): a review of literature. **The Medical Journal of Basrah University**, v. 27, p. 46-53, 2009.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601-620, 2007.

MAYDT, D.; SPIRT, S.; MUSCHELKNAUTZ, C.; STAHL, W.; MULLER, T. J. J. Chemical reactivity and biological activity of chalcones and other α,β -unsaturated carbonyl compounds. **Xenobiotica**, v. 43, n. 8, p. 711-718, 2013.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 374-392, 2012.

MENNA-BARRETO, R. F., HENRIQUES-PONS, A., PINTO, A. V., MORGADO-DIAZ, J. A., SOARES, M. J., DE CASTRO, S. L. - Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1034-1041, 2005.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; LARANJA, G. A. T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; CASTRO, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seeds oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**, v. 103, p. 111-117, 2008.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; GONÇALVES, R. S. L.; COSTA, E. M.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones is mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 5, p. 644-653, 2009.

MICHELS, P. A. M.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1463-1477, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas, 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454>.

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

MUKHERJEE, A.; DUTTA, S.; SHANMUGAVEL, M.; MONDHE D. L.; SHARMA, P. R.; SINGH, S. K.; SAXENA, A. K.; SANYAL, U. 6-Nitro-2-(3-hydroxypropyl)-1H-benz[de]isoquinoline-1,3-dione, a potent antitumor agent, induces cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, p. 1-8, 2010.

MUNAFO, D. B.; COLOMBO, M. I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3619-3629, 2001.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

OKIMOTO, Y.; WATANABE, A.; NIKI, E.; YAMASHITA, T.; NOGUCHI, N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. **FEBS Letters**, v. 474, p. 137-140, 2000.

OLIVEIRA, R. B.; PASSOS, A. P. F.; ALVES, R. O.; ROMANHA, A. J.; PRADO, M. A. F.; SOUZA FILHO, J. D.; ALVES, R. J. *In vitro* evaluation of the activity of aromatic nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 141-144, 2003.

PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1777, p.1249-1262, 2008.

PATTERSON, J. S.; BARBOSA, S. E.; FELICIANGELI, M. D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta Tropica**, v. 110, p. 187-199, 2009.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends Parasitology**, v. 30, p. 289-298, 2014.

PAULIN, J. The chondriome of selected trypanosomatidia. Three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 403-413, 1975.

PEDROSA, R. C.; BEM, A. F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R. C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clinica et biológica**, v. 20, p. 191-208, 1953.

PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 2, p. 323-334, 2007.

PIÑEYRO, M.; PIZARRO, J.; LEMA, F.; PRITSCH, O.; CAYOTA, A.; BENTLEY, G.; ROBELLO, C. Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Structural Biology**, v. 150, p. 11-22, 2005.

POMPELLA, A.; MAELLARO, E.; CASINI, A. F.; FERRALI, M.; CICCOLI, L.; COMPORTI, M. Measurement of lipid peroxidation *in vivo*: a comparison of different procedures. **Lipids**, v. 22, n. 3, p. 206-211, 1987.

PRASAD, S.; YADAV, V. R.; RAVINDRAN. J.; AGGARWAL, B. B. ROS and CHOP are critical for dibenzylideneacetone to sensitize tumor cells to TRAIL through induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins. **Cancer Research**, v. 71, p. 538-549, 2011.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100, 2001.

RASSI, JÚNIOR, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v. 95, p. 524-234, 2009.

RASSI, JÚNIOR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275-291, 2012.

RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBAIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 357-366, 2006.

RODRIGUES, J. C.; SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 87-98, 2006.

RODRIGUES, J. H. D. S.; UEDA-NAKAMURA T.; CORRÊA A. G.; SANGI D. P.; NAKAMURA C. V. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

ROMÃO, P. R.; TOVAR, J.; FONSECA, S. G.; MORAES, R. H.; CRUZ, A. K.; HOTHERSALL, J. S.; NORONHA-DUTRA, A. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 355-363, 2006.

ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C.; ROCHA, M. G.; DUARTE, A. C. M.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 742-749, 2008.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L. *Trypanosoma cruzi*: Activity of Essential Oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007.

SANZ-RODRIGUEZ, C. E.; CONCEPCIÓN, J. L.; PEKERAR, S.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Bisphosphonates as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, 12377-12387, 2007.

SESPA. Secretaria de Estado de Saúde Pública. Sespa vai combater subnotificação dos casos de Chagas, 2011. Disponível em: <http://www.agenciapara.com.br/noticia.asp?id_ver=87033>.

SESPA. Secretaria de Estado de Saúde Pública. Diagnóstico precoce é fundamental para o controle da doença de Chagas, 2012. Disponível em: <<http://www.saude.pa.gov.br/index.php/noticias/192-diagnostico-precoce-e-fundamental-para-o-controle-da-doenca-de-chagas>>.

SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; FERNANDES, M. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; LOPES, F. A.; SIMONE, C. A.; ANDRADE, C. K. Z.; PINTO, A. V.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, S. L. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of

derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5030-5038, 2008.

SILVEIRA, A. C. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. **Saúde Brasil**, v. 1, p. 212-218, 1983.

SIPOS, I.; TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 1575-1581, 2003.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 49-58, 2012.

SMIRLIS, D.; DUSZENKO, M.; RUIZ, A. J.; SCOULICA, E.; BASTIEN, P.; FASEL, N.; SOTERIADOU, K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & Vectors**, v.3, p. 1-15, 2010.

SOBREIRA, A. C. M.; GOMES, V. B. A. F.; SILVA, M. A. M.; OLIVEIRA, M. F. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Iguatu, CE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 193-196, 2001.

SOBRINHO, J. L. S.; MEDEIROS, F. P. M.; LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; NETO, P. J. R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOEIRO, M. N. C.; CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 1, p. 105-121, 2009.

SOUZA, D. H.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D.; MICHELS, P. A.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

STEINDEL, M.; PACHECO, L. K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. F.; CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina state, Brazil. **Parasitology**, v. 60, p. 25-32, 2008.

STEFANELLO, T. F.; PANICE, M. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; SARRAGIOTTO, M. H.; AUZÉLY-VELTY, R.; NAKAMURA, C. V. *N*-Butyl-[1-(4-Methoxy)Phenyl-9*H*- β -Carboline]-3-Carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 7112-7120, 2014.

STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Problemática de la enfermedad de Chagas. **Simpósio Internacional Academia Nacional de Medicina**, Buenos Aires, v. 59, p. 147-165, 1999.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W.; **Atlas Didático – O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011. 50p.

TOVAR, J.; WILKINSON, S.; MOTTRAM, J. C.; FAIRLAMB, A. H. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the *tryA* locus. **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 653-660, 1998.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 335-344, 2003.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211-220, 2004.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 191, p. 421-427, 1980.

UD DIN, Z. U.; FILL, T. P.; ASSIS, F. F.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; KAPLUM, V.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V.; OLIVEIRA, K. T.; RODRIGUES-FILHO, E. Unsymmetrical 1,5-diaryl-3-oxo-1,4-pentadienyls and their evaluation as antiparasitic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 1121-1127, 2014.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, p. 149-156, 2015.

URBINA, J. A.; CRESPO, A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, p. 225-239, 1984.

VALDEZ, R. H.; TONIN, L. T. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; DÍAZ, J. A. M., SARRAGIOTTO, M. H., NAKAMURA, C. V. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 110, n. 1, p. 7-14, 2009.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae – *Trypanosoma cruzi*/*T. Rangeli*: vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, p. 137-147, 2009.

VAMECQ, J.; DESSEIN, A. F.; FONTAINE, M.; BRIAND, G.; PORCHET, N.; LATRUFFE, N.; ANDREOLLOTTI, P.; CHERKAOUI-MALKI, M. Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p.1388-1400, 2012.

VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; SUDATI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. *In vitro* antitrypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, v. 137, n. 11, p. 1661-1670, 2010.

VERCESI, A.; BERNARDES, C.; HOFFMAN, M.; GADELHA, F.; DOCAMPO, R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi in situ*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14431-14434, 1991.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, v. 24, p. 1317-1331, 1994.

WHO - World Health Organization. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina, 2007.

WHO - World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis), 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; BROMLEY, E. V.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17062–17071, 2002.

WORTHEN, C.; JENSEN, B. C.; PARSONS, M. Diverse Effects on Mitochondrial and Nuclear Functions Elicited by Drugs and Genetic Knockdowns in Bloodstream Stage *Trypanosoma brucei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-13, 2010.

YU, H. J.; SHIN, J.; NAM, J. S.; KANG, B. S.; CHO, S. D. Apoptotic effect of dibenzylideneacetone on oral cancer cells via modulation of specificity protein 1 and Bax. **Oral Diseases**, v. 19, p. 767–774, 2013.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-128, 2004.

APÊNDICE 1