



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO HINOJOSA VALDEZ

**“ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE COMPOSTO
CARBOLÍNICO ASSOCIADO A DIFERENTES FÁRMACOS
SOBRE *Trypanosoma cruzi*”**

RODRIGO HINOJOSA VALDEZ

**“ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE COMPOSTO
CARBOLÍNICO ASSOCIADO A DIFERENTES FÁRMACOS
SOBRE *Trypanosoma cruzi*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

V145a Valdez, Rodrigo Hinojosa.

Atividade tripanocida de composto carbolínico associado a diferentes fármacos sobre *Trypanosoma cruzi* / Rodrigo Hinojosa Valdez. – Londrina, 2011.
80 f. :il.

Orientador: Celso Vataru Nakamura.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Chagas, Doença de – Teses. 3. Fármacos – Teses. 4. Microbiologia – Teses. I. Nakamura, Celso Vataru. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 616.937.3

RODRIGO HINOJOSA VALDEZ

**“ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE COMPOSTO CARBOLÍNICO
ASSOCIADO A DIFERENTES FÁRMACOS SOBRE *Trypanosoma cruzi*”**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr^a. Fabíola Barbieri Holetz
FIOCRUZ – Curitiba - PR

Prof. Dr. Phileno Pinge-Filho
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr^a. Mônica Lúcia Gomes
UEM – Londrina - PR

Londrina, 4 de novembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, por ter me aceitado novamente em uma orientação demonstrando confiança ao abrir as portas do laboratório e me permitir realizar o trabalho de doutoramento.

À Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada-Ogatta, que com seu auxílio, incentivo e conselhos possibilitou a conclusão do trabalho.

À Prof^a Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni por sua grande colaboração e valorosas sugestões na realização dos experimentos.

Aos professores Benicio Alves de Abreu Filho, Tânia Ueda-Nakamura e Benedito Prado Dias Filho, pela colaboração e conhecimentos compartilhados.

Aos professores da Pós-graduação, por contribuírem para minha formação profissional e aos colegas do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pela companhia e amistosso convívio durante os créditos.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá, que estiveram sempre dispostos a colaborar: Elizandra A. Britta, Adriana Oliveira dos Santos, Raíssa B. Pedroso, Karin J. Pelizzaro Rocha, Eliana H. Endo, Patrícia R. Santos, Jackeline T. Guinoza-Siraichi, Milene V. Lopez, Helena T.Takahashi, Marco Antonio Costa, Andréa M. Koroishi, Karine Zanolli, Érika Izumi e demais colegas.

Aos Técnicos dos laboratórios que trabalhei, os quais sempre me apoiaram e possibilitaram que eu realizasse meus experimentos da melhor maneira possível.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Às Agências Financiadoras; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Financiadora de Estudos e Projetos/ FINEP, Programa de Apoio a núcleos de Excelência/Fundação Araucária - PRONEX.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou. Obrigado, gente!

A todos que se fizeram presentes ao meu lado em toda esta jornada.

OBRIGADO.

*"Se enxerguei mais longe, foi porque
me apoiei nos ombros de gigantes"
(Isaac Newton).*

*"Las posibilidades del arte de
combinar no son infinitas, pero
suelen ser espantosas"
(Jorge Luis Borges).*

VALDEZ, Rodrigo Hinojosa. “Atividade tripanocida de composto carbolínico associado a diferentes fármacos sobre *Trypanosoma cruzi*”. 2011. 80f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Dentre as doenças infecciosas endêmicas existentes no continente americano encontra-se a tripanosomíase descrita por Carlos Chagas no início do século XX, também chamada doença de Chagas. Esta enfermidade é causada por um protozoário denominado *Trypanosoma cruzi* e aflige em torno de 9 milhões de pessoas desde o México ao sul da América do Sul. Não existe descrito pela literatura vacina para doença de Chagas, apenas medidas profiláticas de controle na transmissão. Os dois fármacos existentes, benznidazol e nifurtimox, para o tratamento dessa doença apresentam efeitos colaterais importantes e são parcialmente eficazes. Na busca de alternativas para o tratamento, diversos grupos vêm desenvolvendo pesquisas a partir de substâncias isoladas de origem vegetal e também a partir de substâncias sintéticas. Neste contexto, os alcalóides carbolínicos mostram-se promissores compostos bioativos, pois possuem uma variedade de atividades biológicas, como anticonvulsivante, ansiolítico, sedativo, antimicrobiano, inseticida e antiparasitário. Em estudo anterior *in vitro* ficou demonstrada a atividade tripanocida destes compostos bem como a sua baixa toxicidade. No presente trabalho avaliou-se a atividade sinérgica *in vitro* de composto carbolínico (C4) associado aos fármacos benznidazol, cetoconazol e anfotericina B pela técnica do checkerboard, avaliou-se também a atividade tripanocida de C4 associado ao benznidazol sobre camundongos infectados experimentalmente. Os resultados indicaram uma atividade sinérgica entre o carbolínico e benznidazol *in vitro*. Foi observado ainda que, sobre o modelo animal, a mesma associação resultou em atividade sinérgica similar, diminuindo a parasitemia e aumentando a sobrevivência dos animais infectados. Estes resultados encorajam o aprofundamento de estudos sobre este composto a fim de determinar o mecanismo de ação, bem como seu desempenho em ensaios clínicos.

Palavras-chave: Benznidazol. Doença de chagas. Carbolínico. Sinergismo.

VALDEZ, Rodrigo Hinojosa. "Trypanocidal activity carboline compound associated with different drugs on *Trypanosoma cruzi*". 2011. 80f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Among the endemic infectious diseases present in American continent, is the American trypanosomiasis described by Carlos Chagas in the early XX century, also called Chagas' disease. This illness is caused by a protozoan *Trypanosoma cruzi* and afflicts around 9 million people from Mexico to southern South America. There is not described in the literature a vaccine for Chagas' disease, only prophylactic measures for transmission control. Current treatment is based in only two drugs that have demonstrated some activity against *T. cruzi*, benznidazole and nifurtimox, both toxic and partially effective. In the search of alternative treatment, several research groups have studied natural and synthetic products with trypanocidal activity. In this context carbolines alkaloids are well know compounds that have a variety of biological activities such as anticonvulsant, anxiolytic, sedative, antimicrobial, insecticidal and antiparasitic. In a previous study it was demonstrated the trypanocidal activity of these class of compounds as well as its low toxicity, both *in vitro*. In this study was evaluated the synergistic activity of a carboline compound associated with benznidazole, ketoconazole and amphotericin B an *in vitro* study by checkerboard technique. Was also evaluated the action of this compound on experimentally infected mice with carboline isolated and associated with the drugs mentioned above. The results indicated a synergistic *in vitro* activity between carboline and benznidazole. It was also observed a similar result over murine model, decreasing the parasitaemia and increased the survival rate of infected animals. These results encourage further studies on this compound to determine the mechanism of action as well as their performance in clinical trials.

Keywords: Benznidazole. Chagas disease. Carbolines. Synergism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBS	Tampão Salina Fosfato
pH	Potencial de Hidrogênio
IC	Concentração Inibitória
EC	Concentração Efetiva
ml	Mililitro
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
nm	Nanômetro
μ g	Micrograma
mg	Miligrama
kg	Quilograma
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
°C	Graus Celsius
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
DMSO	Dimetilsulfóxido
LIT	Liver Infusion Tryptose

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO BIBLIOGRAFICA	11
OBJETIVOS	25
REFERÊNCIAS	26
FIGURAS	33
ANEXOS	36
ANEXO A - Antimicrobial Agents and Chemotherapy	37
ANEXO B – Protocolos	56
ANEXO C - Resultados complementares	70
CONCLUSÃO	77
PERSPECTIVAS FUTURAS	79
REFERÊNCIAS	80

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma enfermidade presente em todo o continente americano, e mesmo depois de mais de cem anos de sua descoberta, no Brasil existem milhões de pessoas que ainda são infectadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é o agente causador desta patologia.

Esta doença pode ser considerada um tema emblemático na saúde pública brasileira, pois reflete aspectos distintos da nossa sociedade. Se por um lado, a patologia foi descoberta e detalhadamente descrita por Carlos Chagas no início de século XX, demonstrando a capacidade investigativa e científica que brasileiros podem apresentar, por outro lado demonstra aspectos extremamente negativos de nossa sociedade como a exclusão social, a incapacidade e demora de governos em lidar com uma doença tropical levando ao sofrimento de milhares de pessoas, uma vez que, mesmo a exatos cento e dois anos de sua descoberta, a doença de Chagas ainda não possui um tratamento efetivo, nem tampouco uma vacina eficaz. O único medicamento disponível no Brasil é o benznidazol, que é apenas parcialmente eficaz e tóxico. Esta realidade tem motivado diversos grupos de pesquisa a investigarem novos compostos químicos potencialmente tripanocidas, sem, no entanto chegar a uma molécula que possa substituir o benznidazol. Nesse contexto, compostos carbolínicos apresentam-se como biomoléculas com potencial atividade tripanocida.

Diversas são as etapas na pesquisa de novos fármacos, desde o isolamento e a caracterização da molécula, a comprovação de sua atividade *in vitro* e *in vivo* sobre modelos animais até a realização de ensaios clínicos. Experimentos complementares deverão serealizados para comprovar que a substância em teste não possui toxicidade, ou que a possui em níveis toleráveis pelo corpo humano.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Doença de Chagas, um breve histórico

Foi na cidade de Lassance, em Minas Gerais, que o pesquisador brasileiro Carlos Justiniano das Chagas desenvolveu o que talvez tenha sido a maior descoberta da história da ciência brasileira. Em 1907 foi designado pelo governo brasileiro para combater uma epidemia de malária naquela cidade. Dentre seus trabalhos se dedicava a estudar possíveis parasitas presentes em animais e com possibilidade de infectar humanos. Algum tempo depois ao examinar o sangue^a de uma menina de dois anos de idade chamada Berenice observou pelas lentes de seu microscópio pela primeira vez um protozoário flagelado que denominou *Schizotrypanum cruzi*, sendo uma referência e homenagem ao seu amigo e mestre Oswaldo Cruz (Chagas, 1909). Desde então começou a estudar a biologia deste interessante micro-organismo e seu comportamento em animais experimentais e entre diversos artigos publicados sobre o tema explicou mais tarde detalhes da descoberta:

... quando no sangue periférico de uma criança febril, foi observado o flagelado patogênico, de sua biologia já possuíamos noção completa, adquirida em demorados estudos anteriores (Chagas, 1922).

Esse fato único na história da medicina, ou seja, de um mesmo pesquisador descobrir e descrever o quadro clínico de uma nova doença, descrever seu respectivo agente infeccioso, ciclo de vida deste agente, seus vetores e reservatórios, abrangendo assim todos os aspectos básicos de sua epidemiologia e patologia. Mereceu grande destaque à época de publicação de seus trabalhos, obtendo reconhecimento nacional e internacional culminando com a condecoração do prêmio Schaudinn, concedido de quatro em quatro anos pelo Instituto de Doenças Tropicais de Hamburgo ao melhor trabalho em protozoologia (Anônimo, 1912 apud Kropf, 2006).

O que merece destaque é que a comissão julgadora desse prêmio, da qual fazia parte Oswaldo Cruz, era composta pelos mais importantes nomes da microbiologia e da medicina tropical da época, tais como Koch, Manson, e Golgi, entre outros, sendo ainda Carlos Chagas indicado duas vezes ao prêmio Nobel, para os anos de 1913 e 1921 (Coutinho

^a Dada às condições do laboratório provisório em Lassance, Chagas realizou um exame a fresco, ou seja, a observação ao microscópio, de uma gota de sangue entre lâmina e lamínula.

e cols., 1999). Graças a essa valiosa contribuição de Carlos Chagas, denomina-se a doença e seu agente etiológico como doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*.

Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

Passados mais de cem anos de sua descoberta, infelizmente no Brasil e em diversos países da América Latina, a doença de Chagas é considerada um grave problema de saúde pública. Estimativas indicam que existam cerca de 9 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* em todo o continente americano e 25 a 90 milhões em risco de infecção (WHO, 2007; Hotez et al., 2008; Rassi et al., 2010).

De maneira geral, a incidência da doença vem caindo lentamente, se comparamos com o número de pacientes chagásicos em 1978, que segundo estimativas o Ministério da Saúde existiam cinco milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, ou o equivalente a 4,2% da população (Rey, 2008). No início do século XXI, Dias e cols. publicaram um levantamento epidemiológico no qual relatam existir em torno de três milhões e meio de pessoas infectadas no Brasil (Dias e cols., 2002). Apesar de relevantes esforços no sentido de diminuir o número de pacientes chagásicos, é preocupante o fato que existam ainda milhões de pessoas com doença de Chagas no Brasil.

Como dito anteriormente, esta enfermidade não é uma exclusividade do Brasil, sendo encontrada em todo o continente americano. A doença de Chagas tem uma grande relevância na saúde pública da América Latina, sendo a segunda enfermidade associada a vetor, em prevalência e mortalidade (após a malária). Estima-se que ocorram aproximadamente 200.000 novos casos por ano e em torno de 21.000 mortes associadas a doença de Chagas (WHO, 2007). Esta enfermidade é considerada a parasitose latinoamericana de maior impacto socioeconômico, uma vez que a transmissão natural está diretamente relacionada às condições de vida da população nas áreas de risco, e estudos epidemiológicos anteriores na região constataram que cerca de 25% da população encontra-se em risco de contrair a doença (Gurtler e cols., 2003).

Os dados epidemiológicos demonstram uma revoltante realidade, na qual milhões de pessoas consideradas chagásicas possuem o protozoário *T. cruzi* em sua circulação e colonizando seus tecidos. Este quadro por si só justifica investimentos maciços em prevenção, tratamento e pesquisa sobre a doença de Chagas. Porém a interpretação dos resultados epidemiológicos e/ou científicos obtidos é de fundamental importância:

Faz-se ciência com fatos, como uma casa com pedras; porém, uma acumulação de fatos não é ciência, exatamente como um aglomerado de pedras não é uma casa. (Henri Poincaré).

Características do parasita

Como descrito anteriormente, o agente etiológico da doença de Chagas chama-se *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente ao gênero *Trypanosoma* sp. e em função disto a doença de Chagas também é chamada de tripanossomíase americana, pois ocorre somente neste continente.

T. cruzi é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e apresenta uma complexa variação morfológica e fisiológica possuindo três principais formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Os membros desta ordem possuem uma única mitocôndria que percorre todo o corpo celular e se caracterizam pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, que é uma região diferenciada da mitocôndria, o seu interior é preenchido por uma matriz pouco densa à microscopia eletrônica, e há uma estrutura filamentosa formada por ácido desoxirribonucléico ou DNA, uma espécie de nucleóide. Esse DNA do cinetoplasto é denominado de kDNA (De Souza, 2008).

A família é constituída por protozoários parasitas uniflagelados, monoxênicos ou heteroxênicos, na qual também estão presentes outros parasitas de importância médica, veterinária e agrônômica como *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, responsáveis pela tripanossomíase africana (também chamada doença do sono); *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. tropica* responsáveis pelas leishmanioses tegumentares; *L. donovani* e *L. infantum* responsáveis pela leishmaniose visceral (Rey, 2008), e tripanosomatídeos do gênero *Phytomonas* sp. que são protozoários fitopatógenos que apesar de não parasitarem o homem têm uma grande importância econômica, já que podem parasitar culturas de mandioca, coqueiros, tomate e café causando prejuízos, como por exemplo *P. françai*, *P. serpens* e *P. staheli* (Camargo, 1999).

T. cruzi, assim como outros micro-organismos eucariontes, possui estruturas celulares bem organizadas, sendo algumas delas peculiares. A membrana celular é de natureza lipoprotéica, e é sustentada por uma rede de microtúbulos subpeliculares, colocados paralelamente uns aos outros. Esses microtúbulos são de natureza protéica e são responsáveis pela forma rígida da estrutura do protozoário. Apresenta ainda o blefaroblasto, que é um

corpúsculo basal formado pela continuação dos microtúbulos do flagelo; a mitocôndria única e o cinetoplasto descritos anteriormente; o ácidocalcissomo, que é uma organela ácida contendo uma alta concentração de fósforo complexado com cálcio na forma de cátions, tendo como principal função o armazenamento dessas substâncias químicas no seu interior, para posterior utilização pela célula na osmoregulação e sinalização celular (Rey, 2008; De Souza, 2002; Moreno & Do Campo, 2009).

Existem ainda outras estruturas importantes como o glicosomo, que é um vacúolo que possui em seu interior enzimas envolvidas em obtenção de energia pela via glicolítica; resorvosomos, que são vacúolos presentes apenas na forma epimastigota e responsável pelo armazenamento de lipídeos e proteínas, especialmente a cisteína proteinase denominada cruzipaina, que é uma enzima proteolítica de natureza glicoprotéica a qual parece estar envolvida na diferenciação e penetração do parasita na célula hospedeira, sendo então considerada um importante fator de virulência (Cazzulo e cols., 1997; Sant'Anna e cols., 2004).

Outra estrutura interessante presente em *T. cruzi* e compartilhada com outros protozoários é o citóstoma, uma estrutura especializada na entrada de nutrientes, formada pela invaginação de uma porção da membrana plasmática na região próxima a bolsa flagelar (região de onde emerge o flagelo) encontrada nas formas epimastigota e tripomastigota (De Souza e cols., 1978; De Souza, 2002; Nakamura e cols., 2005).

Estes protozoários possuem também organelas típicas de células eucariontes como complexo de Golgi, sistema retículo endoplasmático liso e o granuloso, lisossomos, ribossomos etc.

O protozoário *T. cruzi* apresenta muitas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade o que levou autores a classificá-lo em cepas ou estirpes, como a Y, por exemplo, (Silva & Nussenzweig, 1953).

Outras classificações levando em conta características filogenéticas comuns entre cepas de *T. cruzi* foram realizadas, como uma caracterização molecular deste parasita, propondo duas linhagens principais, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) (Anonymous, 1999), sendo esta última subdividida em sublinhagens (a-e) (Brisse, et al. 2001). Acredita-se que estas subdivisões estejam relacionadas com a evolução do protozoário juntamente com seus hospedeiros mamíferos principais e também com o seu potencial patogênico (Abolis e cols. 2011)

TcI apresenta uma grande diversidade genética, e estes diferentes genótipos tem ampla distribuição no continente americano, estando presente nos ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre. Os hospedeiros mais comuns são mamíferos marsupiais do gênero *Didelphis* (gambás) (Cura e cols., 2010; Herrera e cols., 2009; Ramírez et al., 2011; Guhl e Ramírez, 2011; Abolis e cols. 2011). Na linhagem TcII predomina o ciclo de transmissão doméstico e está mais presente nos países do cone sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) sendo que o hospedeiro mais comum são animais do gênero *Dasytus* (tatus) (Yeo e cols., 2005; Zalloum e cols., 2005; Abolis e cols. 2011).

Mais recentemente outra classificação, baseada em diferentes marcadores moleculares, propõe que *T. cruzi* seja organizado em seis discretas unidades de tipagem (DTUs- Discrete Typing Units / I-IV) (Zingales e cols. 2009; Abolis e cols. 2011).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer por diferentes maneiras; de forma natural, através de fezes ou urina contaminadas de insetos vetores; pela via oral; transplacentária; ou pode ocorrer também de maneira artificial em decorrência do próprio avanço da medicina, podendo ser por: transfusão sanguínea, transplante de órgãos infectados e por acidentes de laboratório.

A forma de transmissão vetorial ocorre com a participação de insetos triatomíneos, os quais pertencem à ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e sub-família *Triatominae* e são os chamados hospedeiros invertebrados (Lent, 1999). Os triatomíneos são noctívagos e são hematófagos em todos os estágios da vida, geralmente se nutrem sobre marsupiais, roedores e aves, passaram a buscar o sangue humano ou de cães e gatos quando estes começaram a viver em áreas do hábitat natural dos triatomíneos e estes se adaptaram às casas rurais e ao peridomicílio. A picada é indolor, podendo demorar 20 min ou mais, e em algumas pessoas provoca intensa reação alérgica. Durante o ato de alimentar-se (repasto) ou depois, os insetos costumam defecar sendo este fato de grande importância na transmissão da tripanossomíase (Lent, 1999).

Dentre os gêneros de triatomíneos, três se destacam com maior interesse para medicina, os quais são justamente os insetos responsáveis pela transmissão vetorial da doença de Chagas, são eles: *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*, que juntos abrangem mais de 100 espécies distribuídas por toda a América Latina. A OMS, em um levantamento feito em 1990, reportou as seis espécies de maior importância: *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *P. megistus* (Lent, 1999). Em 2000, 10 anos depois, um novo estudo mostrou apenas três espécies ainda significativas: *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. dimidiata*. A diminuição de casos de transmissão vetorial, bem como a diminuição do número

de espécies significativas decorre da melhoria nas condições habitacionais e do controle populacional dos vetores pelo uso de inseticidas em áreas circunvizinhas às comunidades em risco (Moncayo, 2003).

Em relação à transmissão vetorial, de acordo com o Ministério da Saúde – MS (2005), o Brasil apresenta duas grandes áreas distintas geograficamente no padrão de transmissão de doença de Chagas. As regiões originalmente de risco para transmissão vetorial é a Amazônia Legal. Da primeira fazem parte os estados de AL, BA, CE, GO, MG, PB, PE, PI, PR, RN, RS e SE. Estas regiões, baseando-se em dados epidemiológicos e entomológicos, foram consideradas pelo MS já em 2005 áreas livres da transmissão pelo principal vetor, o *Triatoma infestans* (Ministério da Saúde, 2005). Sendo que posteriormente veio o reconhecimento da Organização Pan-Americana da Saúde e da Organização Mundial da Saúde, do Brasil ser uma área livre de transmissão por *Triatoma infestans* (OPAS, 2006).

O Brasil se tornou o primeiro país da América Latina a eliminar a transmissão da doença de Chagas pelo inseto assassino chamado, Triatoma infestans. A Organização Pan-Americana da Saúde anunciou em nove de julho de 2006, apresentando ao Ministro da Saúde Agenor Álvares, o título internacional de eliminação da transmissão de doença de Chagas por este vetor (OPAS, 2006).

Torna-se importante enfatizar, no entanto, que tal certificação não representa o controle efetivo da doença no Brasil. A certificação representa somente a eliminação (interrupção momentânea) da transmissão da doença especificamente pelo triatomíneo da espécie *T. infestans*. Diferentemente da erradicação, que representa a interrupção definitiva da transmissão mesmo na ausência de qualquer ação de controle. A eliminação pressupõe a manutenção de alguma ação de controle e vigilância para que a interrupção se mantenha (Silveira, 2002).

Atualmente, o risco de transmissão vetorial nos estados citados anteriormente depende da persistência de focos residuais de *T. infestans*, com casos isolados em alguns poucos locais. Há ocorrência ainda de transmissão por outras espécies de *Triatoma* sp. como *T. braziliensis* e *T. pseudomaculata*, assim como outras espécies pertencentes ao gênero *Panstrongylus*, como *P. megistus* e *P. lutzi*.

Já a Amazônia Legal compreende os estados do AC, AM, AP, RO, RR, PA, TO e parte do MT e MA e apresenta peculiaridades que necessitam de um modelo de vigilância diferenciado, sendo os casos de transmissão oral um problema mais imperativo que a transmissão vetorial domiciliar (Ministério da Saúde, 2005).

A transmissão congênita ocorre em um número muito menor que a vetorial sendo que até o ano 2000 em torno de 100 casos tinham sido relatados tanto no Brasil quanto na Argentina (Gurtler e cols., 2003). A transmissão ocorre quando existem ninhos de amastigotas na placenta, e em consequência de um processo de suscetibilidade imunológica, tripomastigotas originários destes ninhos podem alcançar a circulação fetal, causando assim a transmissão via transplacentária. A transmissão por via oral ocorre de forma natural, e em várias situações, desde animais ingerindo triatomíneos infectados, até pessoas ingerindo alimentos contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados. A penetração do parasita pode, nestes casos, ocorrer pela mucosa da boca e de outras porções do trato gastrointestinal, íntegra ou lesada (Pérez-Gutierrez e cols., 2006).

Outros modos de transmissão, como por transfusão sanguínea, foram detectados a partir de 1935, porém somente na década de 1980, com a emergência da AIDS, que se iniciou um exame mais rigoroso dos doadores e controle dos estoques sanguíneos com fármacos antiparasitários. Apesar disso, no início dos anos 1990, a transmissão por transfusão de sangue oriundo de estoques contaminados ainda era um problema sério em vários países endêmicos da América Latina, visto que nesta época, apenas Brasil, Argentina e Uruguai possuíam legislação específica para qualidade do sangue (Dias e cols., 2002). Também houve detecção de casos de infecção através de transplante de órgãos, porém o controle já é realizado por meio de exames nos doadores. Apesar de todos os esforços individuais e conjuntos, o controle da doença apresenta resultados diferentes, visto que os investimentos e a legislação de cada país impedem que a transmissão seja interrompida total e simultaneamente (Dias e cols., 2002). E mesmo em regiões onde são raros os casos de doença de Chagas, é importante um trabalho de vigilância epidemiológica eficiente.

No ano de 2005, um surto registrado numa área turística do sul do Brasil^a atraiu a atenção internacional como consequência de ter afetado um grupo de turistas estrangeiros e de ter sido registrada alta morbidade e mortalidade (Steindel e cols., 2008).

T cruzi é considerado um parasita obrigatório, e são dois os hospedeiros durante o ciclo de vida deste protozoário, um inseto vetor e um mamífero. As formas epimastigotas (formas replicativas extracelulares) multiplicam-se no intestino médio do vetor.

^a Em de março de 2005, foram identificados 24 casos de doença de Chagas aguda no estado de Santa Catarina, sul do Brasil. Todos estavam relacionados a ingestão de caldo de cana contaminado com *Trypanosoma cruzi*. Esta região não era considerada uma área de transmissão vetorial de doença de Chagas em humanos (Steindel e cols., 2008).

Após esta etapa, essas formas migram para o intestino posterior onde se aderem à superfície mucosa e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes e não replicativas). No momento do repasto sangüíneo, o inseto libera essas formas infectivas nas fezes e urina que entram no mamífero através de lesões na pele, muitas vezes pela própria pessoa parasitada, que ao coçar o local da picada do triatomíneo acaba carreando o protozoário para o interior de seu corpo. No local da picada pode surgir uma reação inflamatória localizada seguida de uma tumoração cutânea, hiperemia e ligeiro dolorimento local. Esta lesão inicial é denominada de chagoma de inoculação. Pode ocorrer também na região ocular ou em suas imediações, a reação inflamatória acompanhada, de conjuntivite e de edema bpalpebral, que impede a abertura do olho correspondente. Neste caso a lesão é denominada de sinal de Romaña e torna-se um sintoma importante no diagnóstico clínico de paciente chagásico (Romaña, 1935; Rey, 2008).

Uma vez na corrente sangüínea, o tripomastigota invade células do hospedeiro (macrófagos, miócitos) e no seu interior diferencia-se em amastigota (forma replicativa intracelular). Estas formas se multiplicam e ainda no interior da célula hospedeira diferenciam-se em tripomastigotas. Estes são liberados na corrente sangüínea (tripomastigotas sangüíneos) após ruptura celular, e podem invadir novas células ou infectar o inseto vetor, durante um novo repasto (De Souza e cols., 2010).

Aspectos clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta duas fases, aguda e crônica. A fase aguda geralmente apresenta uma lesão inflamatória, o chagoma, no local de entrada do parasita. No período de duas semanas a um mês, ocorrem quadros febris discretos, linfadenopatia, náusea, mal estar geral e hepatoesplenomegalia. Em casos mais graves pode haver irritação da meninge, taquicardia, arritmias e outras alterações cardíacas, que em casos raros levam o indivíduo à morte (Tanowitz e cols., 1992). O envolvimento cardíaco ocorre em mais de 90% dos casos agudos de doença de Chagas (Parada e cols., 1997). Existem pacientes chagásicos que durante a fase aguda não apresentam a sintomatologia típica, apresentada acima, sendo então a fase aguda assintomática. Esta variação no aparecimento dos sintomas pode ser explicada pela diferença de virulência entre as cepas de *T. cruzi* bem como com o estado imunitário do hospedeiro (Parada e cols., 1997).

Quando a infecção inicial não é tratada, com o passar dos dias a sintomatologia regride, o número de parasitas diminui na circulação, tornam-se raros, e a

doença evolui para a fase crônica. Nesta fase, distintas possibilidades de evolução da doença podem ocorrer, e parece importante tanto o papel desempenhado pelo parasita como a resposta imune do hospedeiro. Usualmente, a fase crônica instala-se como forma indeterminada, que se caracteriza pela comprovação sorológica e/ou parasitológica da infecção, com ausência de sinais e sintomas da doença, sendo que a forma crônica indeterminada é a forma mais frequente da doença de Chagas e geralmente não leva a óbito. O grande problema é a possível evolução da forma crônica indeterminada para forma crônica cardíaca, digestiva ou mista. Nesta etapa da doença podem aparecer eventos tromboembólicos, falência cardíaca, arritmias, aneurismas, mionecroses e hipertrofia miocelular, levando a casos chagásicos típicos de dilatações do coração (megacárdio), cólon (megacólon) e esôfago (megaesôfago) causando um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e podendo evoluir ainda para o óbito (Brasileiro Filho e cols., 2000; Teixeira e cols., 2006).

Seja na fase aguda ou na fase crônica, a forma cardíaca da doença é talvez um dos piores e mais comuns agravos causados por esta patologia, sendo considerado o aspecto clínico mais importante da doença de Chagas devido às suas características, frequência e gravidade. A patogênese da cardiomiopatia chagásica não está totalmente elucidada, em parte porque a progressão da doença depende de complexas interações parasito-hospedeiro.

Quatro principais mecanismos patogênicos têm sido descritos: danos diretos no miocárdio causados pelo parasita (com secreção de enzimas proteolíticas), forte reação imunológica no tecido, chegando a causar uma reação auto-imune local, disfunção autonômica do tecido cardíaco^a e microdistúrbios vasculares (Rossi e cols., 1997; Biolo e cols., 2010). Este processo infeccioso localizado no tecido cardíaco pode levar a sérios danos neste órgão tais como insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo, podendo levar a transplantes cardíacos e até mesmo ao óbito. Mesmo que o prognóstico do paciente chagásico não seja tão ruim, em alguns casos a infecção leva a uma diminuição na qualidade de vida desta pessoa, acarretando danos físicos, sociais, psicológicos e aumentando custos ao sistema único de saúde (Biolo e cols., 2010).

^a Por disfunção autonômica cardíaca, entende-se um distúrbio funcional, de natureza primária ou secundária, resultante de alterações puramente funcionais ou orgânicas localizadas em um ou em ambos os componentes do sistema nervoso autônomo (Cotran e cols., 2000).

Há trinta e cinco anos o mesmo medicamento...

Por mais de três décadas, apenas dois fármacos foram descritos como agentes terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benznidazol (**Figura 1**) (Marin-Neto e cols., 2009). Porém apenas um medicamento seria suficiente, caso este fosse eficaz, com baixa toxicidade e baixo custo. Contudo essa não é a realidade.

Es una enfermedad olvidada de pacientes olvidados, fuertemente asociada a la pobreza (Maria Jesús Piñazo).

Seja por desinteresse de companhias farmacêuticas e/ou negligência de governos, existem apenas estes dois fármacos disponíveis para a terapêutica desta patologia, e apesar de que experimentos laboratoriais *in vitro* demonstraram a atividade tripanocida destes fármacos sobre as três formas evolutivas do *T. cruzi* (Croft e cols., 2005), os ensaios clínicos e relatos médicos indicam que esta atividade é parcial e ainda não ficou totalmente comprovado que algum dos agentes produza a cura parasitológica total da tripanossomíase (Rey, 2008). Foram feitos estudos transversais a fim de se avaliar a eficácia *in vivo* do benznidazol e as pessoas tratadas com este produto tiveram o xenodiagnóstico^a negativado após sua administração, efeito supressivo, e retorno à positividade após algum tempo, na maioria dos casos. Em alguns pacientes estudados, o xenodiagnóstico voltou a positivar três anos após o término da medicação (Fernandes e cols., 2009).

Pesquisas anteriores têm revelado que a eficiência destes fármacos varia de acordo com a linhagem do parasita, sistema imune do hospedeiro, bem como com a tolerância dos pacientes ao tratamento (Morello e cols., 1994; Toledo e cols., 2004).

O nifurtimox é um composto nitrofurano que possui atividade tripanocida, porém foi retirado do Brasil, descontinuando assim seu uso terapêutico no país, ficando então o benznidazol como única opção medicamentosa para o tratamento desta tripanossomíase. O benznidazol por sua vez é um derivado nitroimidazol desenvolvido nos anos 1970 e que é usado na dose terapêutica de 5 mg/kg por dia, durante sessenta dias. Quando não há resposta terapêutica seu uso pode ser prolongado por até seis meses, sem a total garantia de sucesso terapêutico ao final deste período.

^a Método diagnóstico, no qual o paciente é picado intencionalmente e de forma controlada por triatomíneos não contaminados, e quatro semanas depois o intestino do triatomíneo é examinado em busca de parasitas (Portela-Lindoso & Yasuda, 2003).

O mecanismo de ação deste composto se dá pela formação de radicais livres e metabólitos eletrofilicos. O processo inicia com a ação do complexo enzimático NADPH-citocromo P-450 sobre a molécula do fármaco, seguido da ação de nitroredutases sobre o grupamento nitro da molécula, com a consequente formação dos radicais livres. Estes, por sua vez, ligam-se a lipídeos, proteínas e DNA do parasita causando danos irreversíveis a estas estruturas do *T. cruzi* (Díaz de Toranzo e cols., 1988; Maya e cols., 2007).

Apesar de possuir certa eficiência sobre *T. cruzi*, o benznidazol pode causar diferentes efeitos tóxicos ao paciente, causando toxicidade sistêmica e diversos efeitos adversos como anorexia, náuseas, vômitos, dores de cabeça, depressão do sistema nervoso central, depressão da medula óssea, convulsões, vertigem, dermatite e até sintomas maníacos. Estes indesejáveis efeitos adversos, causados aos usuários de benznidazol, frequentemente força os clínicos a interromperem o tratamento (Zahoor e cols., 1987; Castro e cols., 2006). Outro fator que contribui para a limitação da eficácia deste fármaco é a variação na susceptibilidade de diferentes cepas do parasita a esta droga (Toledo e cols., 2004).

A busca de vacinas ainda baseia-se em descobertas futuras sobre a antigenicidade apresentada pelo parasita, uma vez que existe uma grande variabilidade de cepas, o que confere uma variabilidade antigênica muito grande a este protozoário dificultando o desenvolvimento de um produto imunobiológico efetivo (Camargo, 2009).

Para eliminação do parasita em sangue contaminado de bancos de sangue a única substância utilizada como quimioprofilático é a violeta genciana adicionada na concentração de 250 µg/ml, o que resulta em 100% de eliminação das formas infectantes. Entretanto seu uso também é limitado pelos efeitos colaterais e pela coloração da pele e da urina dos pacientes transfundidos (Moraes-Souza & Bordin, 2006).

Uma vez que o arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas é extremamente limitado, torna-se imprescindível a descoberta de novos protótipos, e apesar do pouco interesse das indústrias farmacêuticas por este tipo de pesquisa, notáveis avanços na compreensão da biologia, ciclos metabólicos e ultra-estrutura do *T. cruzi* têm sido feitos nas últimas décadas em institutos de pesquisa básica que, ainda não se materializaram em novos e eficientes medicamentos para o tratamento da doença de Chagas (Croft e cols., 2005).

Nos últimos anos, entretanto, a busca por extratos e compostos naturais de ação tripanocida tem aumentado, principalmente pela vantagem de mostrar eficiência e baixa ou nenhuma citotoxicidade (Nagafuji e cols., 2004; Luize e cols., 2006; Sülsen e cols., 2006). As plantas são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos orgânicos de baixo

peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários. O metabolismo secundário tem como função originar compostos que auxiliem as plantas durante o seu desenvolvimento. Tais metabólitos não são considerados essenciais para o desenvolvimento normal da planta, porém oferecem vantagens na sobrevivência da espécie. Atualmente existem mais de cem mil compostos de metabolismo secundário conhecidos e já isolados de plantas superiores. Além da função exercida na planta, também podem apresentar atividades biológicas interessantes quando aplicados na área farmacêutica, em inseticidas, antimicrobianos, corantes, fragrâncias e também na indústria alimentícia (Goossens e cols., 2003).

Diversos produtos naturais têm demonstrado atividade tripanocida (Izumi e cols., 2011), como o extrato aquoso de *Camellia sinensis* que parece inibir a enzima arginina quinase do parasita interferindo assim com seu metabolismo (Paveto e cols., 2004), neolignanais isoladas de folhas de *Piper regnellii* (Luize e cols., 2006), extrato etanólico obtido de *Populus nigra* (Dantas e cols., 2006), óleos essenciais obtidos de *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* e *Ocimum basilicum* (Santoro e cols., 2007), e ainda isoquinolinas isoladas de *Ocotea lancifolia* que possuem intensa atividade sobre tripomastigotas sanguíneas (Fournet e cols., 2007). Além de plantas, outras fontes naturais têm sido objeto de pesquisas a fim de se obter um composto efetivo contra *T. cruzi*, como é o caso do elatol obtido da alga marinha *Laurencia dendroidea* (Veiga-Santos e cols., 2010).

Assim como produtos naturais muitos compostos produzidos em laboratório, sintéticos ou semi-sintéticos, têm demonstrado promissora atividade tripanocida. Estudos anteriores demonstraram várias substâncias com atividade tripanocida e baixa toxicidade como descrito por Garzoni e cols. (2004), em que o grupo relatou a atividade tripanocida do risedronato bisfosfato, e há o caso de β -Lapachonas semi-sintéticas que estudos prévios demonstraram uma promissora atividade tripanocida (Menna-Barreto e cols., 2005; Silva-Junior e cols., 2008). Outro composto sintético já patenteado conhecido como WSP[®] demonstrou boa atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas (Braga e cols., 2005). Já o composto L-leucina-metil éster parece ter boa atividade antiproliferativa sobre formas replicativas de *T. cruzi* (Adade e cols. 2007).

Derivados triazóis como o UR-9825[®] e albacazol, que são inibidores da biossíntese do ergosterol^a, têm apresentado resultados interessantes na inibição do *T. cruzi*,

^a O ergosterol é um esteroide presente na membrana plasmática de fungos e alguns protozoários, como *T. cruzi*. É um composto análogo ao colesterol nas células de mamíferos em termos de função e estrutura, uma vez que é responsável por funções estruturais da membrana, estando ainda relacionado a fluidez e permeabilidade desta. Diversos agentes antifúngicos têm no ergosterol o seu alvo celular, e no caso de *T. cruzi* tem sido indicado como um potencial alvo de novos compostos com atividade tripanocida (Liendo e cols. 1999).

sendo que este último demonstrou ser eficiente na diminuição da parasitemia em animais infectados (Guedes e cols., 2004). Já o fecundo grupo de Julio Urbina publicou diversos trabalhos indicando outros compostos inibidores da biosíntese do ergosterol como possíveis substitutos do benznidazol, tais como TAK – 187[®] (Takeda Chemical Company), D-0870[®] (Zeneca Pharmaceuticals), posaconazol e ravuconazol, este dois últimos estão em fase de testes clínicos (Urbina, 2010).

Compostos Carbolínicos

Assim como as substâncias descritas anteriormente os compostos carbolínicos apresentam-se como prósperos agentes tripanocidas, estes originalmente são encontrados distribuídos na natureza tanto em diversos seres vivos como vegetais, fungos, animais e inclusive em fluidos de seres humanos (Rivas e cols., 1999). Os carbolínicos são uma classe de compostos alcalóides que, além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico hidrogenado de seis membros (Henriques e cols., 1999). Os carbolínicos podem ser divididos em três grupos estruturais dependendo do grau de saturação do anel: (a) totalmente aromáticos, (b) dihidro-carbolínicos ou derivados do harmalano, (c) tetrahydro- β -carbolínicos com anel piridínico totalmente saturado (**Figura 2**) (Glennon e cols., 2000).

Alcalóides β -carbolínicos naturais e sintéticos têm sido alvo de diversos estudos químicos e biológicos, e na natureza estes compostos originam-se do triptofano, por meio da condensação entre a triptamina (produto de descarboxilação do triptofano) e um aldeído ou α -cetoácido, como demonstrado em estudos utilizando a marcação isotópica C-14 (¹⁴C) e Trítio (³H) (Husson, 1985). A obtenção destes compostos pode ser realizada em laboratório e o método mais utilizado para sua síntese é a reação de Pictet-Spengler (**Figura 3**), a qual envolve a condensação sucessiva do triptofano metil éster com aldeídos, originando uma molécula primária de tetrahydro- β -carbolína, que sofrendo substituições dos seus radicais origina moléculas distintas e com atividades distintas (Cox & Cook, 1995). Dentre as atividades biológicas descritas de compostos carbolínicos estão ação anticonvulsivante, antioxidante, ansiolítica, sedativa, antimicrobiana, inseticida e antiparasitária (Cao e cols., 2005), antiviral (Formagio e cols., 2009) e antiprotozoária (Valdez e cols., 2009).

Possíveis efeitos tóxicos destes compostos foram objeto de estudo de grupos de pesquisa, os quais constataram que efeitos tóxicos e mutagênicos são dependentes da estrutura e concentração utilizada. Foi demonstrado por Formagio e cols. (2009) que

diferentes compostos carbolínicos possuem baixa toxicidade sobre células de mamífero de linhagem VERO. Adicionalmente, a existência de alguns tipos de β -carbolínicos no ser humano sugere a presença de vias metabólicas e biossintéticas para estes compostos, tais que o corpo humano seria capaz de interagir com estes compostos, reduzindo assim seus efeitos tóxicos (Rivas e cols., 1999).

Apesar de o mecanismo de ação dos compostos β -carbolínicos não estar totalmente elucidado, trabalhos anteriores têm sugerido que os mesmos poderiam intercalar-se no DNA das células alvo, supondo que, o anel β -carbolínico presente na molécula possuindo uma estrutura planar se depositaria nos pares de bases do DNA, e esta intercalação contribuiria para sua atividade biológica (Borsereau & Coldham, 2004; Zhao e cols., 2006). Estudos anteriores cogitaram a possibilidade dos carbolínicos terem a capacidade de induzir apoptose *in vitro* (Hans e cols., 2005) e como agente tripanocida seu modo de ação parece envolver alterações na síntese de DNA e inibição da cadeia respiratória (Rivas e cols., 1999).

Porém, apesar de diferentes iniciativas e valorosos esforços no sentido de disponibilizar um novo fármaco eficiente para o tratamento da doença de Chagas, até o presente momento não existe um medicamento disponível comercialmente que substitua o benznidazol. Portanto pode-se afirmar: há trinta e cinco anos o mesmo medicamento.

Este fato por si só justifica pesquisas básicas e clínicas com o intuito de desenvolver uma nova formulação farmacêutica eficiente ou ainda novos esquemas terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação antiparasitária *in vitro* e *in vivo* de composto tetrahydro- β -carbólico associado a outros fármacos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de Checkerboard sobre *Trypanosoma cruzi*;
- Verificar o efeito do composto carbólico associado a fármacos de referência *in vitro* na viabilidade de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliar a atividade sinérgica de composto tetrahydro- β -carbólico associado ao benznidazol sobre camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*;
- Utilização da técnica de Real Time-PCR como parâmetro para determinar a cura parasitológica de animais infectados com *T. cruzi*;
- Observar alterações histológicas em animais infectados experimentalmente e submetidos a tratamento com composto carbólico, isolado e associado ao benznidazol;
- Avaliar parâmetros patológicos como presença de infiltrado e inflamatórios e toxicológicos como porcentagem de sobrevivência, ganho de peso e presença de infiltrados inflamatórios em animais infectados e submetidos a tratamento experimental.

REFERÊNCIAS

- ABOLIS, N.G.; ARAÚJO, S.M.; TOLEDO, M.J.O.; FERNANDEZ, M.A; GOMES, M.L. 2011. *Trypanosoma cruzi* I–III in Southern Brazil Causing Individual and Mixed Infections in Humans, Sylvatic Reservoirs and Triatomines. *Acta Tropica*. 120: 167-172.
- ADADE, C.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; DE-CASTRO, S.L.; SOARES, M.J. 2007. Effect of L-leucine Methyl Ester on Growth and Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 101: 69-79.
- _____. Anônimo - O Brasil no exterior. O prêmio Schaudinn Conferido ao Dr. Carlos Chagas, *A Noite*, Rio de Janeiro, 26 de junho de 1912.
- _____. Anonymous. 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (1999), pp. 429–432.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. 2010. Chagas Cardiomyopathy – Where Do We Stand After a Hundred Years? *Progress in Cardiovascular Diseases*. 52: 300-316.
- BORSEREAU, Y.; COLDHAM, I. 2004. Synthesis and Biological Studies of 1-Amino β -Carbolines. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*. 14: 5841-5844.
- BRAGA, M.V.; MAGARACI, F.; LORENTE, S.O.; GILBERT, I. DE SOUZA, W. 2005. Effects of Inhibitors of Delta 24(25) - Sterol Methyl Transferase on the Ultrastructure of Epimastigotes Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*. 11:505-515.
- BRASILEIRO FILHO, G. e cols. 2000. *BOGLIOLO, Patologia*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Pág. 215-299.
- CAMARGO, E.P. 1999. *Phytomonas* and Other Parasites of Plants and Fruit. *Advances in Parasitology*, 42: 29-112.
- CAMARGO, E.P. 2009. Perspectives of Vaccination in Chagas Disease Revisited. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(Suppl. I): 275-280.
- CAO, R.; CHEN, H.; PENG, W. 2005. Design, Synthesis and *in vivo* Anti-tumor Activities of Novel β -Carboline Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 40: 991-1001.
- CASTRO, J.A.; DE MEECA, M.M.; BARTEL, L.C.; 2006. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). *Human Experimental Toxicology*. 25(8): 471-479.
- CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V.; 1997. Cruzipain, the Major Cysteine Proteinase From the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biology Chemistry*. 378: 1-10.
- CHAGAS, C. 1909. Nova Tripanosomíase Americana – Estudos Sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo de *Schizotrypanum cruzi*, Agente Etiológico de Nova Entidade Mórvida do Homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:159-218.
- CHAGAS, C. 1922. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e Verificação da Tripanozomíase Americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 15:67-76.

COTRAN, R.S.; VINAY, K.; COLLINS, T. e cols. 2000. *ROBBINS, Patologia Estrutural e Funcional*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Pág. 377-415.

COUTINHO, M.; FREIRE JR, O.; PINTO DIA, J. C.; 1999. The Nobel Enigma: Chagas' Nominations for the Nobel Prize, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, (suppl). I. 123-129.

COX, E.D.; COOK, J.M. 1995. The Pictet-Spengler Condensation: A New Direction for an Old Reaction. *Chemical Review*. 1797-1842.

CROFT, S.L.; BARRET, M.P.; URBINA, J.A. 2005. Chemotherapy of Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 21: 508-512.

CURA, C.I.; MEJIA-JARAMILLO, A.M.; DUFFY, T.; BURGOS, J.M.; RODRIGUERO, M.; CARDINAL, M.V.; KJOS, S.; GURGEL-GONCALVES, R.; BLANCHET, D.; DE PABLOS, L.M.; TOMASINI, N.; DA SILVA, A.; RUSSOMANDO, G.; CUBA, C.A.; AZNAR, C.; ABATE, T.; LEVIN, M.J.; OSUNA, A.; GURTLER, R.; DIOSQUE, P.; SOLARI, A.; TRIANA-CHAVEZ, O.; SCHIJMAN, A.G.; 2010. *Trypanosoma cruzi* I Genotypes in Different Geographical Regions and Transmission Cycles Based on a Microsatellite Motif of the Intergenic Spacer of Spliced Leader Genes. *International Journal of Parasitology*. 40: 1599–1607.

DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA, H.S. 2006. The Effect of Bulgarian Propolis Against *Trypanosoma cruzi* and During its Interaction With Host Cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101: 207-11.

DE SOUZA, W.; PALOMO, A.M.; ROBLES, A.G. 1978. Cell Surface of *Trypanosoma cruzi*: Cytochemistry and Freeze Fracture. *Journal of Cell Science*. 33: 285-292.

DE SOUZA, W. 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 269-285.

DE SOUZA, W. 2008. An Introduction to the Structural Organization of Parasitic Protozoa.. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 822-838.

DE SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*. 10:1-18.

DIAS, .J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 603-612.

DÍAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J. 1988. Interaction of Benznidazole Reactive Metabolites with Nuclear and Kinetoplastic DNA, Proteins and Lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. 44, 880–881.

FERNANDES, C.D.; TIECHER, F.M.; BALBINOT, M.M.; LIARTE, D.B.; SCOLL, D.; STEINDEL, M, ROMANHA, A. 2009. Efficacy of Benznidazol Treatment for Asymptomatic Chagasic Patients from State of Rio Grande do Sul, Evaluated During Three Years Follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1): 27-32.

- FORMAGIO, A.S.N.; TONIN-DUSMAN, L.T.; FOGLIO, M.A.; MADJAROF, C.; DE CARVALHO, J.E.; DA COSTA, W.F.; CARDOSO, F.P.; SARRAGIOTTO, M.H. 2009. Synthesis and Antitumoral Activity of Novel 3-(2-Substituted-1-3-4-Oxadiazol-5yl) and 3-(5-Substituted-1-2,4-triazol-3-yl) β -Carboline Derivatives. *Bioorganic Medical Chemistry*. 16:9660-9667.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ROJAS DE ARIAS, A.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. 2007. Phytochemical and Antiprotozoal Activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*. 78: 382-384.
- GARZONI, L.R.; WAGHABI, M.C.; BAPTISTA, M.M.; DE CASTRO, S.L.; MEIRELES, M.N.L.; BRITTO, C.C.; DOCAMPO, R.; OLDFIELD, R.; URBINA, J. 2004. Antiparasitic Activity of Risedronate in a Murine Model of Acute Chagas' disease. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23: 286-290.
- GLENNON, R.A.; DUKAT, M.; GRELLA, B.; HONG, S.S.; CONSTANTINO, L.; TEITLER, M.; SMITH, C.; EGAN, C.; DAVIS, K.; MATSON, M.V. 2000. Binding of β -Carboline and Related Agents at Serotonin (5HT-2) and (5HT-1A) Dopamine D2 and Benzodiazepine Receptors. *Drug and Alcohol Dependence*. 60: 121-132.
- GOOSSENS, A.; HÄKKINEN, S.T.; LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO T.; BIONDI, S.; SUTTER, V.; LAMMERTYN F.; NUUTILA, A.M.; SODERLUND, H.; ZABEAU, M.; INZE, D.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. 2003. A Functional Genomics Approach Toward the Understanding of Secondary Metabolism in Plant Cells. *PNAS*. 100(14): 8595–8600.
- GUEDES, P.M.M.; URBINA, J.A.; LANA, M.; AFONSO, L.C.C.; VELOSO, V.M.; TAFURI, W.L.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; CHIARI, E.; BAHIA, T. 2004. Activity of the New Triazole Derivative Albacazole Against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Dog Hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 4286-4292.
- GUHL, F.; RAMÍREZ, J.D. 2011. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the Need of Genetic Subdivision? *Acta Tropica*. 119: 1–4.
- GURTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E.; 2003. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. *Emerging Infectious Disease*. 9: 29-32.
- HANS, G.; MALGRANGE, B.; LALLEMEND, F.; CROMMEN J.; WISLET-GENDEBIEN, S.; BELACHEW, S.; ROBE, P.; ROGISTER, B.; MOONEN, G.; RIGO, J.M. 2005. β -Carbolines Induces Apoptosis in Cultured Cerebellar Granule Neurons via the Mitochondrial pathway. *Neuro-pharmacology*. 48: 105-117.
- HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. 1999. *Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos*. p.641-656. Universidade/UFRS. - Ed. UFSC. Porto Alegre/Florianópolis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia, da Planta ao medicamento*.
- HERRERA, C.; GUHL, F.; FALLA, A.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; VALLEJO, G.A.; BARGUES, M.D. 2009. Genetic variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *Journal of Parasitology Research*. doi:10.1155/2009/897364.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. 2008. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: a Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2: 01–11.

HUSSON, H.P., 1985. The Simple Indole Alkaloids. In: BROSSI, A. *The Alkaloid: Chemistry and Pharmacology*. Academic in Press Inc. Orlando, 26.: 35-50.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO B.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V.; 2011. Natural Products and Chagas' disease: a Review of a Plant Compounds Studied for Activity Against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Products Report*. 28:809-823.

LENT, H. 1999. Evolução dos Conhecimentos sobre Vetores da Doença de chagas 90 Anos Após a sua Descoberta. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94. (Suppl I): 89-92.

LIENDO, A.; VISBAL, G.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R.; URBINA, J.A. 1999. Sterol Composition and Biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 104: 81–91.

LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. 2006. Activity of Neolignans Isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK Against *Trypanosoma cruzi*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 29: 2126-2130.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FAÚNDEZ, J.F.M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. 2007. Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs Against *Trypanosoma cruzi* and Their Interaction with the Mammalian Host. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A(146):601-620.

MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A.J.R.; AVEZUM, A.J.R; MATTOS, A.C.; RASSI, A. 2009. The BENEFIT trial: Testing the Hypothesis that Trypanocidal Therapy is Beneficial for Patients with Chronic Chagas Heart Disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104:319–324.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A.V.; MORGADO-DIAZ, J.A.; SOARES, M.J.; CASTRO, S.L. 2005. Effect of a β -Lapachone - Derived Naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: Identification of Target organelles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 1034-1041.

Ministério da Saúde. 2005. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revistada Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38. Suppl III: 1- 29.

MONCAYO, A. 2003. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends After the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*., 98. (Suppl I): 577-591.

MORAES-SOUZA, H.; BORDIN, J.O. 2006. Strategies for Prevention of Transfusional-Associated Chagas' disease. *Transfusion Medicine Reviews*. 10(3):161-170.

- MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B.K.; SPEISK, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. 1994. Trypanocidal Effect of Boldine Related Alkaloids Upon Several Strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107: 367-371.
- MORENO, S.N.J.; Do CAMPO, R. 2009. The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56: 208-213.
- NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ABE, F. 2004. Trypanocidal Constituents in Plants – with anolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 27: 193-197.
- NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; DE SOUZA, W. 2005. Visualization of the Cytostome in *Trypanosoma cruzi* by High Resolution Field Emission Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron imaging. *FEMS Microbiology Letters*, 242: 227-230.
- OPAS. 2006. The Newsletter of Pan American Health Organization. Disponível em: <http://www.paho.org/English/DD/PIN/ptoday24_aug06.htm>. Acessado em: 20 jul. 2011.
- PARADA, H.; CARRASCO, H.A.; ANEZ, N. 1997. Cardiac Involvement is a Constant Finding in Acute Chagas' disease: a Clinical, Parasitological and Histopathological study. *International Journal of Cardiology*. 60:49-54.
- PAVETO, C.; GUIDA, M.C.; ESTEVA, M.I.; MARTINO, V.; COUSSIO, J.; FLAWIÁ, M.M.; TORRES, H.N. 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 69-74.
- PÉREZ-GUTIERREZ, E.; AGRELO, R.S.; FIGUEROA, R. 2006. Consulta Técnica em Epidemiologia, Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. 39 (5):512-514.
- PORTELA-LINDOSO, A.A.B.; YASUDA, M.A.S. 2003. Doença de Chagas Crônica: do Xenodiagnóstico e Hemocultura à Reação em Cadeia da Polimerase. *Revista de Saúde Pública*. 37(1): 107-115.
- Ramírez, J.D.; Duque, M.C.; Guhl, F. 2011. Phylogenetic reconstruction based on Cytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. *Acta Tropica*. 119(1): 61-65.
- RASSI J.R.; A., RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. 2010. Chagas Disease. *Lancet* 375, 1388–1402.
- REY, L. 2008. Parasitologia. *Guanab. Koogan*, 4º Ed. Rio de Janeiro. 295-340.
- RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. 1999. Effects of Some β -Carboline Alkaloids on Intact *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *Comparative Biochemical and Physiology*. 122: 27-31.
- ROMAÑA, C. 1935. Acerca de un Sintoma Inicial de Valor para el Diagnóstico de Forma Aguda de la Enfermedad de Chagas. La Conjuntivitis Esquizotripanófica Unilateral (Hipótesis sobre la Puerta de Entrada Conjuntival de la Enfermedad). *Publicaciones MEPR*. 22:16-28.

- ROSSI, M.A.; BESTETTI, R.B. 1997. The Challenge of Chagasic Cardiomyopathy. The Pathologic Roles of Autonomic Abnormalities, Autoimmune Mechanisms and Microvascular Changes, and Therapeutic Implications. *Cardiology*. 86:1-7.
- SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W.; CUNHA E SILVA, N. 2004. Biogenesis of the Reserosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, 10: 637-646.
- SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L. 2007. *Trypanosoma cruzi*: Activity of Essential Oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on Epimastigotes and Trypomastigotes. *Experimental Parasitology*. 116: 283-90.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. 1953 Sobre uma Cepa de *Trypanosoma cruzi* Altamente Virulenta para o Camundongo Branco. *Folia Clinica & Biológica*. 20: 191-208.
- SILVA JUNIOR, 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.; PINTO, A.V.; FERREIRA, V.F.; CASTRO, S.L. 2008. Synthesis and Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Derivatives from Nor-Lapachones and Lapachones. *Bioorganic Medical Chemistry*. 16: 5030-5038.
- SILVEIRA, A.C. 2002. O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991-2001. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília, p.15- 43.
- 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. 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* Isolated from Humans Vectors and Animal Reservoirs Following an Outbreak of Acute Human Chagas Disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 60(1):25-32.
- SÜLSEN, V.; GÜIDA, C.; COUSSIO, J.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. 2006. *In Vitro* Evaluation of Trypanocidal Activity in Plants Used in Argentine Traditional Medicine. *Parasitology Research*. 98: 370-374.
- TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D. MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. 1992. Chagas's Disease. *Clinical Microbiology Review*. 5: 400-419.
- TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. 2006. Evolution and Pathology in Chagas disease – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101(5): 463-491.
- TOLEDO, M.J.O.; BAHIA, M.T.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ALVEZ, C.F.; MARTINS, R.H.; CRUZ R.E.; TAFURI, W.L.; LANA, M. 2004. Effects of Specific Treatment on Parasitological Histopathological Parameters in Mice Infected with Different *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 1045-1053.
- URBINA J.A. 2010. Specific Chemotherapy of Chagas disease: Relevance, Current Limitations and New Approaches. *Acta Tropica*. 115:55–68.

VALDEZ, R.H.; TONIN-DUSMAN, L.T.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; MORGADO-DIAZ, J.A.; SARRAGIOTTO, M.A.; NAKAMURA, C.V.; 2009. Biological Activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide Against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 110:7-14.

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. 2010. In Vitro Anti-Trypanosomal Activity of Elatol Isolated from Red Seaweed *Laurência dendroidea*, *Parasitology*. 137:1661-1670.

WHO (World Health Organization), 2007. New global effort to eliminate Chagas disease. *Weekly epidemiological record* 82 (28/29), 259–260. <http://www.who.int/wer> (accessed on 16.11.2011).

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SANCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.J.; LOPEZ, E.; GONZALEZ, N.; PATTERSON, J.S.; GAUNT, M.W.; ARIAS, A.R.; MILES, M.A. 2005. Origins of Chagas Disease: *Didelphis* Species are Natural Hosts of *Trypanosoma cruzi* I and Armadillos Hosts of *Trypanosoma cruzi* II, Including Hybrids. *International Journal of Parasitology*. 35: 225–233.

ZAHOOR, A.; LAFLEUR, M.V.M.; KNIGHT, R.C.; LOMAN, H.; EDWARDS, D.I. 1987. DNA Damage Induced by Reduced Nitroimidazole Drugs. *Biochemical Pharmacology*. 36(19):3299-3304.

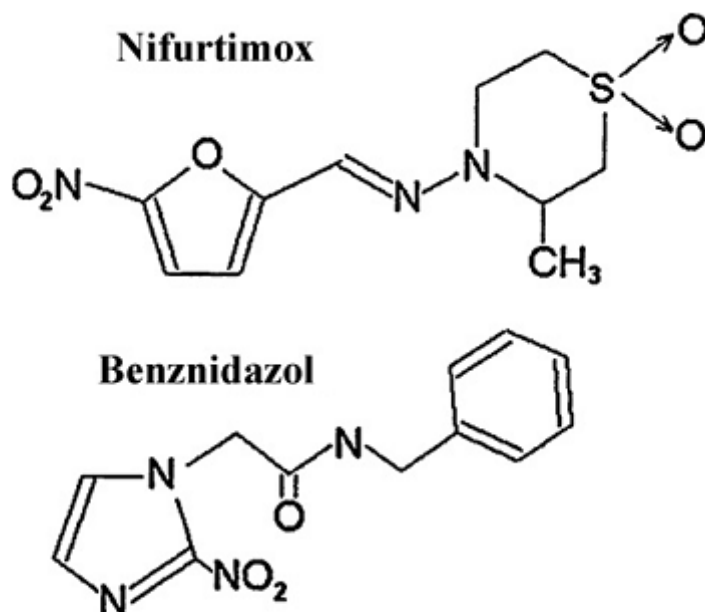
ZALLOUM, L.; GOMES, M.L.; KINOSHITA, A.T.; TOLEDO, M.J.O.; PRIOLI, A.J.; ARAÚJO, S.M. 2005. *Trypanosoma cruzi*: Two Genetics Groups in Paraná State, Southern Brazil. *Experimental Parasitology*. 111: 55-58.

Zingales, B.; Andrade, S.G.; Briones, M.R.S.; Campbell, D.A.; Chiari, E.; Fernandes, O., Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A.M.; Machado, C.R.; Miles, M.A.; Romanha, A.J.; Sturm, N.R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A.G.; 2009. A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104, 1051–1054.

ZHAO, M.B.I.L.; WANG, W.; WANG, C.; BAUDY-FLOC' H.M.; JU, J.; PENG, J.; SHIQ, I. 2006. Synthesis and Cytotoxic Activities of β -Carboline Amino Acid Ester Conjugates. *Bioorganic Medical Chemistry*. 14: 6998-7010.

FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos compostos descritos na literatura utilizados para o tratamento da doença de Chagas: nifurtimox e benznidazol



Fonte: adaptado de Urbina, 2010.

Figura 2 - Estrutura molecular do composto – 4 *N*-butil-1-(4-Dimetilamino) fenil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolínico-3-carboxamida.

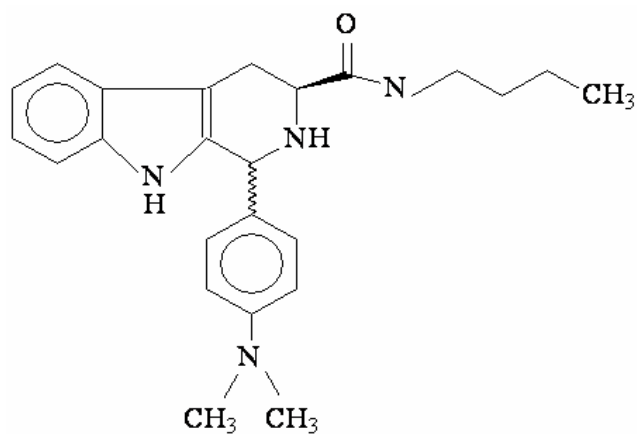
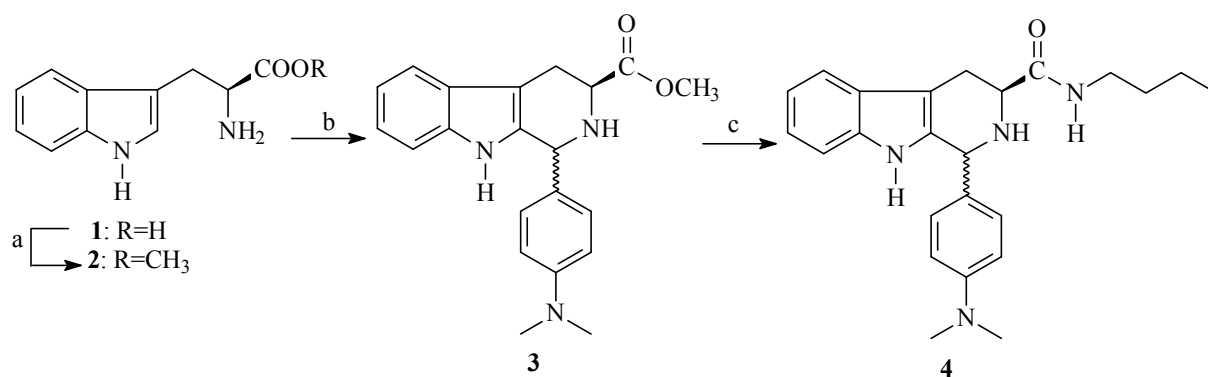


Figura 3 - Representação esquemática da reação pictet spengler, na qual o triptofano é condensado sucessivamente com moléculas de aldeído.



ANEXOS

ANEXO A

(Antimicrobial Agents and Chemotherapy)

IN VITRO AND IN VIVO TRYPANOCIDAL SYNERGISTIC ACTIVITY OF N-BUTYL-1-(4-DIMETHYLAMINO)PHENYL-1,2,3,4-TETRAHYDRO- β -CARBOLINE-3-CARBOXAMIDE) ASSOCIATED WITH BENZNIDAZOLE

Rodrigo Hinojosa Valdez^a; Lilian Tatiani Düsman Tonin^b; Tânia Ueda-Nakamura^c;
Sueli Oliveira Silva^c; Benedito Prado Dias Filho^{a,c}; Edilson Nobuyoshi Kaneshima^c; Sueli
Fumie Yamada-Ogatta^a; Lucy Megumi Yamauchi^a; Maria Helena Sarragiotto^b; Celso Vataru
Nakamura^{a,c,*}

Summary

American trypanosomiasis, or Chagas' disease, is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects around 9 million people throughout the American continent. The available treatment is based on two nitroheterocyclic drugs, nifurtimox and benznidazole, both only partially effective and toxic. In this context, new drugs must be found. In our previous work, the tetrahydro- β -carboline compound *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide, named C4, showed a potent *in vitro* trypanocidal effect. The goal of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* trypanocidal effect of compound C4 associated with other drugs (benznidazole, ketoconazole and amphotericin B). For this, we used the checkerboard technique to analyze the effect of combinations of C4-reference drugs. C4 was assayed in a murine model, alone as well as in association with benznidazole. We also evaluated the parasitaemia, mortality, weight, and the presence of amastigote nests in cardiac tissue. A synergic effect of C4 plus benznidazole against epimastigote and trypomastigote forms was observed *in vitro*, and in the murine model we observed a substancial reduction in parasitaemia levels and lowered mortality rates. These findings encourage supplementary investigations of carbolines compounds as potential new trypanocidal drugs.

Keywords: Tetrahydro- β -carboline. Trypanocidal. Checkerboard. Murine model.

^a Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86051-990, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 - CCS, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

* Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Bloco B-08 - CCS, Avenida Colombo, 5790; BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone number: +55 44 3011-5012. Fax: +55 44 3011-5046. E-mail address: cvnakamura@uem.br

1 Introduction

Chagas' disease is an illness that affects around 9 million people on the American continent, and in Brazil there are an estimated three million people infected with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of this disease (29).

Although it has been one hundred years since its discovery by the Brazilian researcher Carlos Chagas, the treatment of Chagas disease is still limited and unsafe. The currently available treatment is two nitroheterocyclic drugs, nifurtimox and benznidazole (BZ), with limited results seen only in the acute phase of disease. Both of these drugs are toxic and must be taken for long periods of time. Moreover, in Brazil, only BZ is available (19). In this context new drugs or new therapeutical approach must be developed. In this respect we recently reported that the tetrahydro- β -carboline compound *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide, named C4, showed a strong *in vitro* trypanocidal effect (28).

In the treatment of many infectious diseases, therapeutical associations are adopted with very successful results. Previous works have shown the importance of the combination therapy against several microorganisms, such as bacteria (17, 21, 24) and fungi (8, 13, 14), and over protozoa such as *Plasmodium* (10,18,30), *Leishmania* (7, 16), and *T. cruzi* (3, 20). In one of the few studies that reported synergistic activity of drugs on *T. cruzi* treatment, there was demonstrated good synergistic activity between parthenolide and BZ (20).

Therefore, based on the successful results of known therapeutical associations the goal of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of the C4 associated with different reference drugs (BZ, ketoconazole and amphotericin B).

2 Materials and methods

2.1 *In vitro* assay

Parasite and mammalian cell culture:

LLCMK₂ (monkey kidney cells) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum (FCS - Gibco, Invitrogen Corporation, New

York, USA), 50 mg/L gentamicin and buffered with sodium bicarbonate. The epimastigote form of *T. cruzi* Y strain was grown in Liver Infusion Tryptose (LIT) supplemented with 10% FCS at 28 °C for 96 h. Trypomastigote forms were obtained by infection of LLCMK₂ cell monolayer in DMEM at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere.

The checkerboard technique assay over epimastigote and trypomastigote forms of Trypanosoma cruzi:

In this assay we evaluated the trypanocidal effect of compound C4 associated with other drugs (BZ, ketoconazole and amphotericin B) over epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*. Against epimastigotes, all the compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and LIT medium to obtain concentrations of C4 (10 µg/mL to 0.625 µg/mL); BZ (5 µg/mL to 0.156 µg/mL); ketoconazole (10 µg/mL to 0.05 µg/mL) and amphotericin B (5 µg/mL to 0.001 µg/mL). The final concentration of DMSO did not exceed 1%. For each experiment, there was a growth control with and without DMSO. The experiment was performed in a 24 well plate where epimastigote forms were suspended to 10⁶ cell/mL. Each well was filled with a 1 mL suspension containing the parasite, LIT medium, 10% FCS and the compounds to be tested, alone or in combinations. Serial dilutions of the tested drugs were performed at four times, and then concentrated to the desired final concentration. The assay was screened in triplicate.

The cells were incubated at 28 °C and their growth was determined by counting the parasites with a haemocytometer chamber at the time 96 h. The checkerboard technique was also used to calculate FIC (fractional inhibitory concentration) for each drug and FICI (fractional inhibitory concentration index) for the drug combinations. The synergistic effect is defined as an effect produced by a combination of components that is greater than the sum of the effects produced by the components alone (represented for FIC) (25, 26). When the sum of these fractions is 1, the combination is additive; when the sum is <1, the combination is synergistic; when the sum is >1, the combination is antagonistic (5).

Over trypomastigote forms, the tissue-culture-derived parasites were resuspended in DMEM supplemented with FCS containing 10% mouse blood in a concentration of 10⁷ parasites/mL. In a 96-well microplate, 100 µL of this suspension was added to 50 µL of C4 and the same volume of the associated drug (BZ, ketoconazole and amphotericin B), diluted in DMSO and DMEM. After that a serial dilutions of C4 were performed, as described above, to the following concentrations; C4, BZ, and ketoconazole (50

$\mu\text{g/mL}$ to $3.75 \mu\text{g/mL}$) and amphotericin B (10 to $0.1 \mu\text{g/mL}$), then it was incubated for 24 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Considering the mobility of this form of parasite, we used the Pizzi-Brener method which permit distinguishes his viability. In this method an aliquot of $5 \mu\text{L}$ of each sample was placed on slides plus coverslips and immediately counted in an optical microscopy (4). The results were interpreted by the checkerboard technique to determinate the effect of combination of C4 with the other drugs and the fractional inhibitory concentration (FIC) was then calculated. The results were also plotted on an isobologram.

2.2 *In vivo* assay

Trypanocidal in vivo studies:

The animals were infected by intraperitoneal (i.p) injection of 10^4 bloodstream trypomastigotes, and two days post infection (dpi) the experimental treatment was started. Parasitaemia levels were individually checked every day by direct microscopic counting in $5 \mu\text{L}$ of blood from the tip of the tail of mice, as describe above. Mortality was checked daily until 21 dpi and expressed as the percentage of survival. Moreover, the weight of the treated animals were evaluated at 6, 12, 18 dpi.

Animals:

Male BALB/c mice, weighing $20\text{-}25 \text{ g}$, were obtained from Bioterio Central - Universidade Estadual de Maringá/PR. Mice were housed 5 per cage and kept in an environment of $22 \text{ }^\circ\text{C}$ room temperature, $70 \pm 10\%$ relative humidity under a 12/12 h light/dark cycle. The animals were placed there for 10 days to adapt before starting the experiments and maintained under standard conditions in the animal house at our institution. All procedures had prior approval from the local animal ethics committee.

The animals were divided into the following groups: infected and non treated (i), infected and treated with BZ- 100 mg/kg (ii), infected and treated with BZ- 5 mg/kg (iii), infected and treated with C4- 100 mg/kg (iv), infected and treated with C4- 50 mg/kg (v), infected and treated with C4- 5 mg/kg plus BZ- 5 mg/kg (vi) and non infected and non treated (vii). Each group contained five animals, and the experimental treatment was performed by 0.5 mL oral dose (gavage) once a day. The results shown are from three independent experiments.

Histological analysis:

After 21dpi, the hearts were cut longitudinally, rinsed in cold PBS and fixed in Bouin solution. The tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 3 μ m were obtained and stained with hematoxylin-eosin and were analyzed by light microscopy. The number of amastigote nests and of inflammatory infiltrates (more than 10 mononuclear cells) was determined in at least 50 fields (total magnification, 40 X) for each slide. The mean number of amastigotes nests or inflammatory infiltrated per fields was obtained from at least three mice per group with two sections from each tissue.

RT-qPCR:

Real time qPCR was performed to determine the tissue parasite burden in controls, and *T. cruzi*-infected and treated animals. Heart tissues were collected from mice at 21 dpi, weight and washed in PBS. The genomic DNAs were purified using the lyses buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2 mg/mL of proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA)] followed by phenol/chloroform extraction. Samples were mechanically homogenized (Ultra stirrer, Scientific SDN BHD, Malasia) heated for 12 h at 55 °C, and extracted twice with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). Cold ethanol (Merck), twice the volume of the extracted sample, was then added to the aqueous phase and samples were stored at - 20 °C for 12 h. Then, samples were centrifuged for 30 min at 10,000 g, washed with 70% ethanol, dried at room temperature and resuspended in 10 mM Tris HCl pH 8.5. Real-time PCR was performed using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG with ROX reagent (Invitrogen Corporation, New York, USA) with 100 ng of total gDNA. The primer sequences used were TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGT GC-3' and TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' (6). The samples were amplified in a thermal cycler Corbett Rotor-GeneTM with the following PCR conditions: first step (2 min at 50 °C), second step (10 min at 95 °C) and 40 cycles (30 s at 95 °C, 30 s at 57 °C, 30 s at 72 °C, 15 s at 82 °C), followed by a dissociation stage. The results were based on a standard curve constructed with DNA from culture samples of *T. cruzi* epimastigotes.

Statistical analysis:

Homogenous data were analyzed using a One Way Analysis of Variance (ANOVA), and the significances of intergroup differences were analyzed using Dunnett's test. Heterogeneous data were analyzed using Kruskal-Wallis test. All statistical tests were

performed at the $p \leq 0.05$ level of significance. The data are representative of at least three experiments run in duplicate.

All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by UEM ethical committee (Protocol 013/2010).

3 Results

3.1 *In vitro* assay

Trypanocidal activity of C4 associated with other drugs on epimastigote and trypomastigote forms

After treatment of C4 associated with BZ, epimastigote forms were seriously affected, even at low drug concentrations. It was observed that association between C4 and BZ has a synergistic effect with FICI: 0.47, and the C4 – amphotericin B combination displayed a FICI lower than 1 (0.72) also featuring a synergistic effect. However the combination of C4 with ketoconazole resulted in antagonism with FICI: 2.05 (Figure 1 left).

Additionally, the association of C4 with the same drugs over infective forms of the parasite was also evaluated and the cell viability analyzed. Following the treatment period, the viable cells were counted like described in the Materials and methods section. The results were very similar to those found over epimastigote forms. Compound C4 when associated with BZ displayed more effectiveness than when used alone which resulted in a FICI of 0.71, that suggest a synergistic effect. Also the C4 – amphotericin B combination resulted in a synergistic activity with a FICI of 0.77. Nevertheless C4 – ketoconazole association resulted in a FICI: 1.53, suggesting an antagonist effect (Figure 1 right).

3.2 *In vivo* assay

Trypanocidal in vivo studies:

The parasitaemia levels were checked every day, starting at 2 dpi over a 19 day period, and at the end of this stage it was observed that C4 at 100 mg/kg/d and 50 mg/kg/d was able to decrease the parasitaemia levels ($p \leq 0.05$). Moreover we observed an even better result when C4 was associated with BZ at the concentration of 5 mg/kg/d (each one), when compared with infected and untreated group ($p \leq 0.001$). With this treatment the

parasitaemia level came close to naught. It should be pointed out that C4-BZ association caused approximately 99% of parasitaemia reduction in the parasitaemic peak (8th day), while BZ 100 mg/kg/d displayed around 85% of parasite reduction. Additionally, this association was able to reduce the number of parasites more than BZ 100 mg/kg/d not only in the parasitaemic peak, but also in the course of the experimental infection (Figure 2A).

Another way to evaluate the association of C4 and BZ was to calculate the survival rate and evaluate the weight of the animals. The best result for survival rate was obtained when the mice were treated with C4-BZ association. This group had 100% of survival, while the survival rate of the others groups were variable (Figure 2B). For the weight of the animals, the only groups where the mice did not show some loss of weight, were the groups without infection and without treatment. The group treated with C4-BZ association increased their weight in 11.8% on average (Table 1).

Histological analysis:

The cardiac tissue of treated animals showed an important decrease in cardiac inflammatory infiltration when compared with non treated animals, especially in the 100 mg/kg BZ group and BZ associated with C4 (5 mg/kg each) reaching about 80% ($p \leq 0.05$) (Figure 3). The number of amastigote nests suffered an important reduction when the mice were treated with C4 isolated (around 30%) and BZ at 5 mg/kg (around 60%). Additionally, the 100 mg/kg BZ group and BZ associated with C4 (5 mg/kg each) no cardiac parasitism was observed (Figure 3). The histopathological analysis reveals that cardiac tissue appears normal in the groups treated with the association of C4-BZ, with a significant decrease ($p \leq 0.005$) of leukocyte cell infiltration and amastigote nests when compared to infected and untreated group (Figure 4).

RT-qPCR:

Real time qPCR was performed to determine the tissue parasite burden in infection control, uninfected control and *T. cruzi*-infected and treated animals. Despite the fact that all treated groups exhibited amplification products, the C4 plus BZ 5mg/kg (each) had a significant reduction of parasite burden in cardiac tissues when compared to infected and untreated groups ($p \leq 0.001$). It is relevant to point out that the reduction in parasite load displayed by this group was greater than the reduction observed in the group treated with 100 mg/kg of BZ. Nevertheless, all other groups showed just a slight reduction of parasite burden when compared with untreated group (Figure 5).

4 Discussion

More than a century after its discovery, Chagas' disease remains a serious pathology, mainly due to the limited therapeutic options for dealing with this illness. Indeed, the few available drugs are partially effective and toxic in therapeutic concentrations (22, 27). This fact encouraged research of several new compounds with trypanocidal activity (1, 12, 23), but unfortunately a fully effective drug has not been discovered so far.

Tetrahydro- β -carbolines and β -carbolines represent an important class of compounds with several biological activities, as many as antitumoral, antiviral and antiparasitic agents (2, 11, 15). These compounds also showed activity against protozoa such as *T. cruzi*, especially against bloodstream trypomastigote (28).

Here we evaluated the C4 capacity to interact with other drugs and if this interaction increased its trypanocidal activity. The checkerboard strategy is a well known method to verify the potential synergic effect with different drugs (5). The results obtained over epimastigote form led to the interesting conclusion that the association of C4 plus BZ resulted in a synergy between them (FICI= 0.47). A similar result was described in a previous work, with parthenolide (20). On trypomastigote forms, an analogous result was observed, especially when C4 and BZ were tested in combination, leading to synergistic effect, being the FICI value 0.71.

In the case of amphotericin B, a synergistic result was also observed. In both parasite forms evaluated; the FICI values were below 1.0, being 0.72 in epimastigote and 0.77 in trypomastigote forms. Meanwhile, the C4-ketoconazole association caused an antagonistic effect, in both epimastigote and trypomastigote forms, the FICI values were 2.05 and 1.53, respectively, suggesting that maybe these compounds have similar mechanisms of action.

For *in vivo* studies, we selected the compounds C4 and BZ, and its combination. Some interesting results were observed in the C4-BZ group (5 mg/kg each), which showed a higher parasitaemia reduction compared to the drug reference group (BZ - 100 mg/kg). We also want to emphasize that the treatment only with BZ - 5 mg/kg did not result in a trypanocidal effect as those presented by the C4-BZ combination, with a significant difference between them ($p \leq 0.05$). A similar approach was used in another work, where the buthionine sulfoximine was tested in association with nifurtimox (9).

The results obtained from the observation of the animal's deaths through the infection period showed that none of the animals died in the group treated with C4-BZ combination similar to the group without infection. This mortality rate suggests low toxicity,

different than the results obtained with other substances as derived from megalol (23). We can speculate that once we eliminated the parasite infection through treatment, there was no reason for death of animals. In the case of the experiment measuring the animal's weight, all groups showed significant difference when compared with uninfected group ($p \leq 0.05$). This means that the animals lost some weight during the experiment (typical symptom of Chagas disease), except for the C4-BZ group (5 mg/kg each); in this case these animals gained weight during the experiment period.

Another important feature was the number of amastigote nests and inflammatory infiltrates that decreased significantly in the C4-BZ combination ($p \leq 0.05$). This reduction was also observed in histological analysis since it was not possible to observe parasites in the cardiac tissue of animals treated with C4-BZ combination, and protected against characteristic alterations of *T. cruzi* infection.

With the goal of finding and quantifying the parasites located in cardiac tissue, we carried out the Real-time quantitative PCR method of all experimental groups, and we verified that the cardiac parasitism of *T. cruzi* infected and treated mice confirmed the histological analysis conclusions. The Rt-PCR showed us that the number of cardiac parasites suffered a notable reduction ($p < 0.001$), but the experimental treatment did not eliminate all of cardiac trypomastigotes.

In conclusion, all results clearly provide evidence that there was *in vivo* synergistic activity between C4 and benznidazole, suggesting that perhaps these two compounds have different mechanisms of action. Moreover, the results indicate that the use of BZ at low concentrations, associated with the compound C4, may have a therapeutic efficiency similar to that obtained in the concentration currently used, with consequent reduction of the side effects typical of the therapy with BZ and/or the duration of treatment.

Additionally these results support new *in vitro* and *in vivo* studies about the association between β -carboline compounds and other drugs, to treat experimental Chagas' disease. Moreover, it is important to continue with the *in vivo* studies, through different therapeutic protocols and using new drug delivery systems aiming to achieve better results with the available drugs.

Acknowledgements

This study was supported through grants from DECIT/SCTIE/MS and MCT by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/Fundação Araucária), Complexo de Central de Apoio a Pesquisa – UEM (COMCAP) and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Transparency declarations

None to declare

References

1. **Adesse, D., E. M. Azzam, M. N. Meirelles, J. A. Urbina, and L. R. Garzoni.** Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly *in vitro*. 2011. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:203-210.
2. **Baba, M., M. Salim, M. Okamoto, H. Aoyama, Y. Hashimoto, Y. Takebe, J. Paeshuysse and J. Neyts.** 2010. γ -Carboline derivatives as potent and selective inhibitors of bovine viral diarrhea virus (BVDV) replication. *Antiviral Res.* **86**:A29.
3. **Benaim, G., J. M. Sanders, Y. Garcia-Marchán, C. Colina, R. Lira, A. R. Caldera, G. Payares, C. Sanoja, J. M. Burgos, A. Leon-Rossell, J. L. Concepcion, A. G. Schijman, M. Levin, E. Oldfield, and J. A. Urbina.** 2006. Amiodarone has Intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**:892-899.
4. **Brener, Z.** 1962. Therapeutic activity criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **4**:386–396.
5. **Chou, T. C.** 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **58**:621-681.
6. **Cummings, K. L., and R. L., Tarleton.** 2003. Rapid quantification of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. and Biochem. Parasitol.* **129**:53-59.
7. **El-On, L., E. Bazarsky, R. Sneir.** 2007. *Leishmania major*: *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of paromomycin ointment (Leshcutan) combined with the immunomodulator imiquimod. *Exp. Parasitol.* **116**:156-162.

8. **Endo, H. E., D. A. Garcia Cortez, T. Ueda-Nakamura, C. V. Nakamura, and B. P. Dias Filho.** 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Res. Microbiol. **161**:534-540.
9. **Faúndez, M., R. Lopez-Munhoz, G. Torres, A. Morello, J. Ferreira, U. Kemmerling, M. Orellana, and J. D. Maya.** 2008. Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:1837-1839.
10. **Fivelman, Q. L., I. S. Adagu, and D. C. Warhurst.** 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:4097-4102.
11. **Formagio, A. S. N., L. T. Tonin-Dusman, M. A. Foglio, C. Madjarof, J. E. de Carvalho, W. F. da Costa, F. P. Cardoso, and M. H. Sarragiotto.** 2008. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. Bioorg. Med. Chem. **16**:9660-9667.
12. **Izumi, E., T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias Filho, V. F. Veiga Junior, and C. V. Nakamura.** 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. Nat. Prod. Rep. **28**:809-823.
13. **Kamysz, E., O. Simonetti, O. Cirioni, D. Arzeni, G. Ganzetti, A. Campanati, A. Giacometti, E. Gabrieli, C. Silvestri, W. Kamysz, A. Offidani, and F. Barchiesi.** 2011. *In vitro* activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp. Peptides. **32**:99-103.
14. **Kontoyiannis, D. P. and R. E. Lewis.** 2003. Combination chemotherapy for invasive fungal infections: what laboratory and clinical studies tell us so far. Drug Resist. Update. **6**:257-269.
15. **Kumar, A., S. B. Katiyar, S. Gupta, and P. M. S. Chauhan.** 2006. Syntheses of new substituted triazino tetrahydroisoquinolines and β -carbolines as novel antileishmanial agents. Eur. J. Med. Chem. **41**:106-113.
16. **Mbongo, N., P. M. Loiseau, D. G. Craciunescu, and M. Robert-Gero.** 1998. Synergistic effect of Ir-(COT)-pentamidine alizarin red and pentamidine, amphotericin B, and paromomycin on *Leishmania donovani*. Acta Trop. **70**:239-245.
17. **Messadi, A. A., T. Lamia, B. Kamel, O. Salima, M. Monia, and B. R. Saïda.** 2008. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in an invasive care burn unit: A 5-year study, 2000-2004. Burns. **34**:1098-1102.
18. **Pereira, M. R., P. P. Henrich, A. B. S. Sidhu, D. Johnson, J. Hardink, J. V. Deussen, J. Lin, K. Gore, C. O'Brien, M. Wele, A. Djimde, R. Chandra, and D. A. Fidock.** 2011. *In vivo* and *in vitro* antimalarial properties of azithromycin-chloroquine combinations that includes the resistance reversal agent amlodipide. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:3115-3124.

19. **Paulino, M., F. Iribarne, M. Dubin, S. Aguilera-Morales, O. Tapia, and A. O. Stoppani.** 2005. The chemotherapy of Chagas' disease: An overview. *Mini Rev. of Med. Chem.* **5**:499-519.
20. **Pelizzaro-Rocha, K. J., T. S. Tiunan, E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias-Filho, and C.V. Nakamura.** 2010. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine.* **18**:36-39.
21. **Rand, K. H., H. J. Houck, P. Brown, and D. Bennewt.** 1993. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:613-615.
22. **Rodrigues Coura, J. R., and S. L. De Castro.** 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**:3-24.
23. **Salomão, K., E. M. de Souza, S. A. Carvalho, E. F. da Silva, C. A. M. Fraga, H. S. Barbosa, and S. L. De Castro.** 2010. *In vitro* and *in vivo* activities of 1,3,4 thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megalol against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2023-2031.
24. **Sopirala, M. M., J. E. Magino, W. A. Gebreyes, B. Biller, T. Bannerman, J. M. Balada-Llasat, and P. Pancoli.** 2010. Synergy testing by, Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **54**:4678-4683.
25. **Urbina, J. A., J. Vivas, G. Visbal, and L. M. Contreras.** 1995. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**:199– 210.
26. **Urbina, J. A., J. Vivas, K. Lazard, J. Molina, G. Payares, M. M. Pirns, and R. Piras.** 1996. Antiproliferative effects of $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Chemother.* **42**:294–307.
27. **Urbina, J. A.,** 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* **115**:55-68.
28. **Valdez, R. H., L. T. D. Tonin, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias Filho, J. A. Morgado-Diaz, M. H. Sarragiotto, and C. V. Nakamura.** 2009. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **110**:7–14.
29. **WHO-World Health Organization.** 2007. New global effort to eliminate Chagas disease. *Weekly epidemiological record* 82 (28/29), 259-260. <http://www.who.int/wer>
30. **WHO-World Health Organization.** 2010. Guidelines for the Treatment of Malaria. 2nd edition. Geneve.

Legends for Tables and Figures

Table 1 – Weight variation (g) in BALB/c mice treated with different treatment regimen, when compared with time zero (first day of infection).

Figure 1: Isobolograms of the combination of C4 with different concentrations of reference drugs. In the left column (A) the checkerboard technique over epimastigote, and in the right column (B) the results obtained against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. The points below the broken line mean synergistic effect and the points above means antagonistic effect. Notice the FICI results of all experiments is displayed.

Figure 2: Effects of C4 and BZ, alone and in combination on parasitaemia (A) and survival rate (B) in a murine model of Chagas' disease. Male BALB/c mice were inoculated with 10^4 bloodstream trypomastigotes of Y strain; the treatment started 48 h later. The parasitaemia evaluation started on the same day of the beginning of treatment and the parasitaemic peak was around 9th day post infection, or 7th, day of treatment. Asterisks means significant difference between the groups tested with control, ($p \leq 0.001$).

Figure 3: Presence of amastigote nests and inflammatory infiltrated in heart tissue. In the groups treated with BZ - 100 mg/kg and C4 - BZ (5 mg/kg each) the infection and inflammatory infiltration has significantly decreased ($p \leq 0.05$). The asterisks mean significant differences with infection control (* amastigote nests and ** inflammatory infiltration) ($p \leq 0.05$).

Figure 4: Histological analysis of mice cardiac tissue. (A) Non infected group, (B) Infected and non treated group, (C) Infected and treated with C4-50 mg/kg/d group, (D) Infected and treated with Bz-5 mg/kg/d group, (E) Infected and treated with BZ-100 mg/kg/d group, (F) Infected and treated with BZ associated with C4 (5 mg/kg both) group. In (B), (C) and (D) pictures is evident of the presence of amastigote nests (head arrows) and inflammatory infiltrates (Black arrows), the pictures (E) and (F) cardiac tissue appears normal, with some polymorphonuclear cells (F). Optical magnification: 400 X.

Figure 5: Parasite burden in cardiac tissue of BALB/c mice infected with Y strain of *T. cruzi*. The animals were infected and treated with C4 and BZ, alone and in combination. Tissue samples were harvested at 21 dpi. The black asterisk means a significant difference with infection group ($p \leq 0.001$).

Table 1

	<i>6 dpi</i>	<i>12 dpi</i>	<i>18 dpi</i>
<i>No infected</i>	+ 5.5%	+ 4.9%	+ 10.7%
<i>C4 + BZ 5 mg/kg/d (each)</i>	+ 4.0%	+ 7.5%	+ 11.8%
<i>BZ 5 mg/kg/d</i>	- 1.4%	- 7.6%	- 4.1%
<i>BZ 100 mg/kg/d</i>	- 1.6%	- 2.9%	- 1.1%
<i>C4 – 50 mg/kg/d</i>	0.0%	- 9.0%	- 6.4%
<i>C4 – 100 mg/kg/d</i>	- 1.8%	- 5.7%	- 7.3%
<i>Infection control</i>	- 5.1%	- 12.2%	- 21.3%

dpi = days post infection

Figure 1

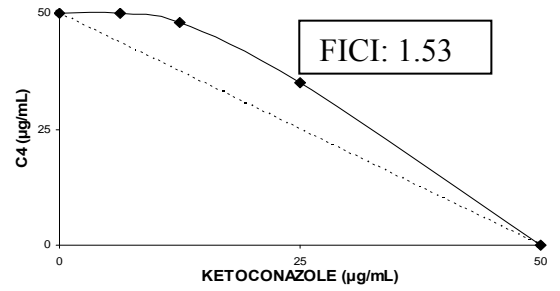
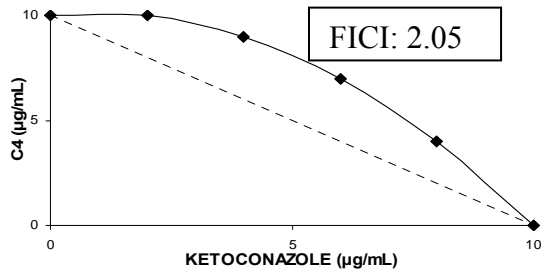
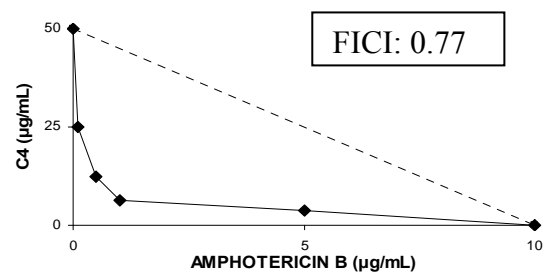
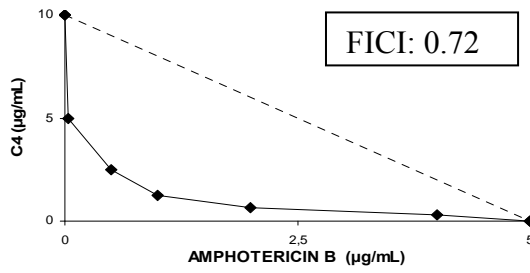
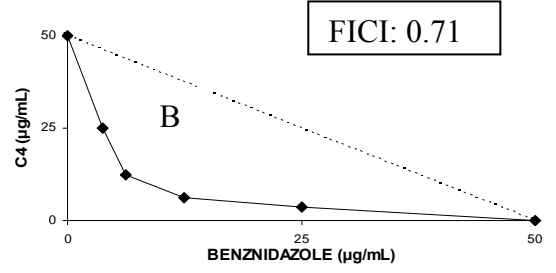
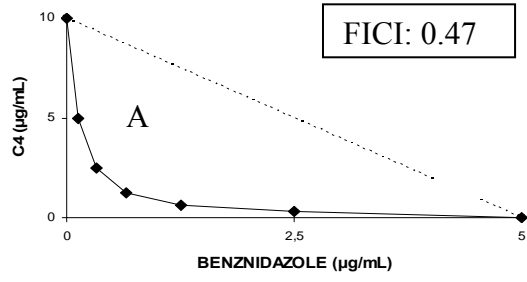


Figure 2

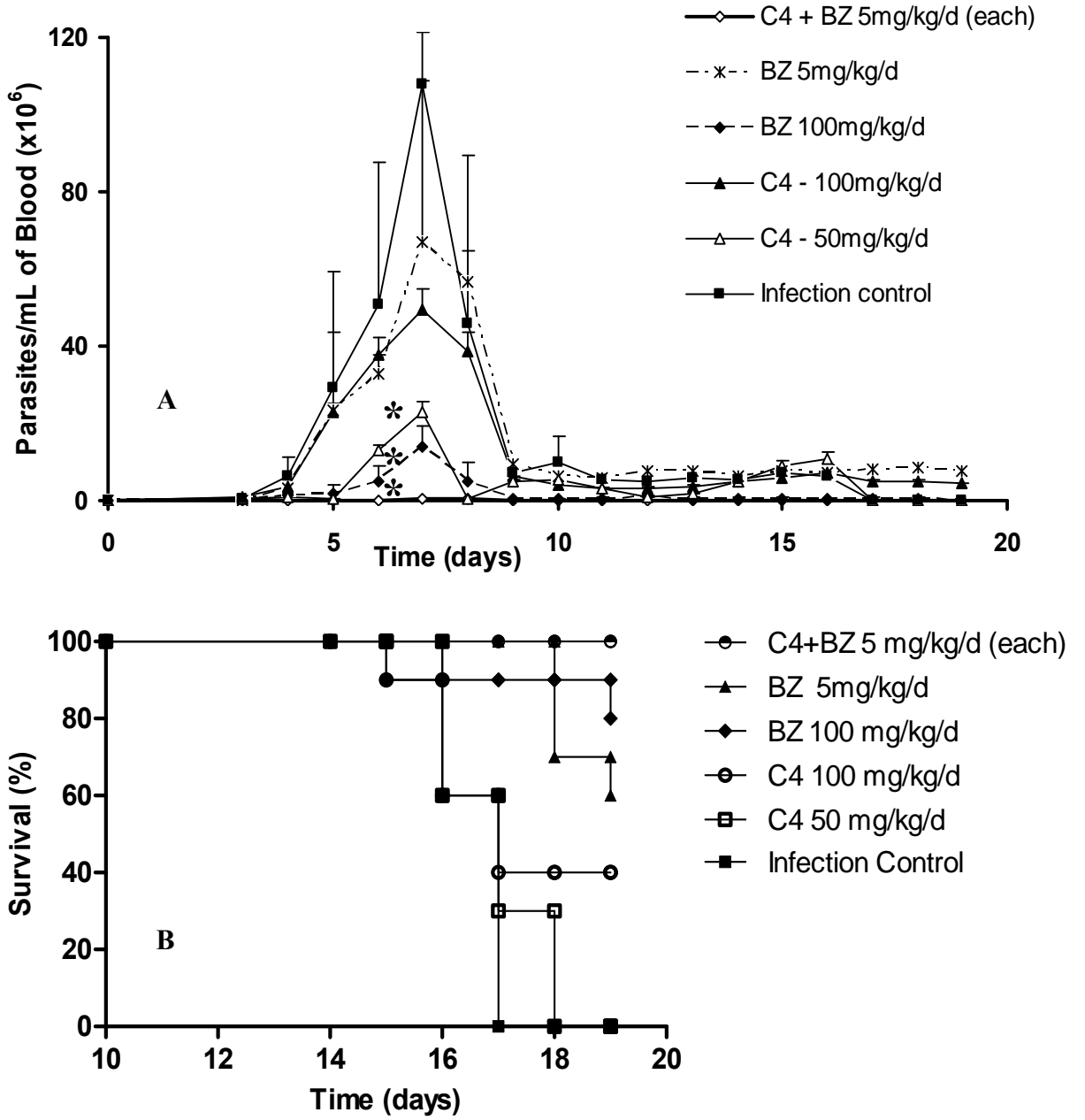


Figure 3

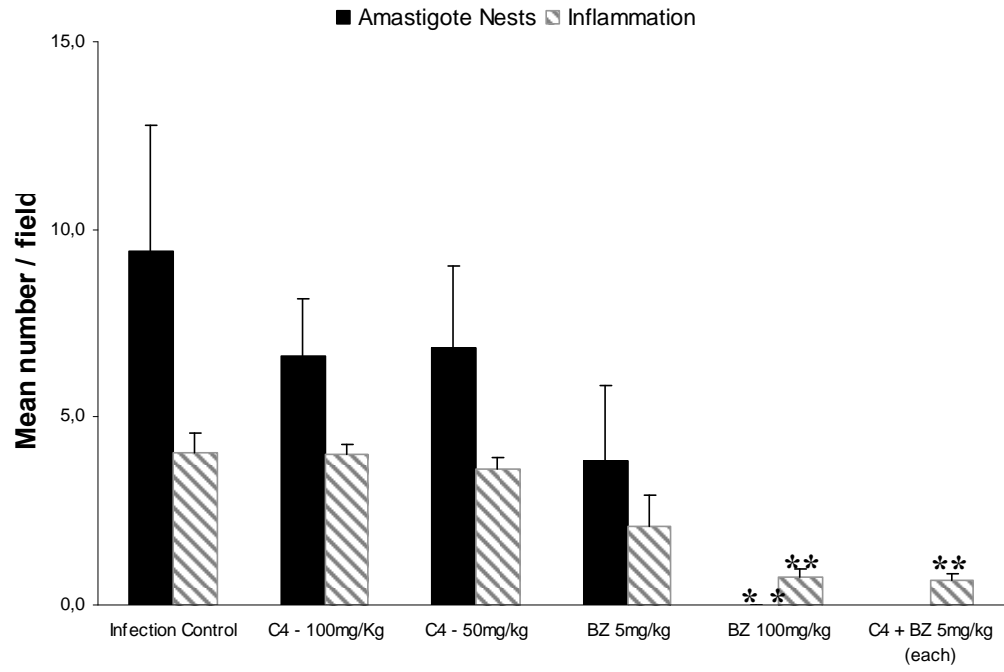


Figure 4

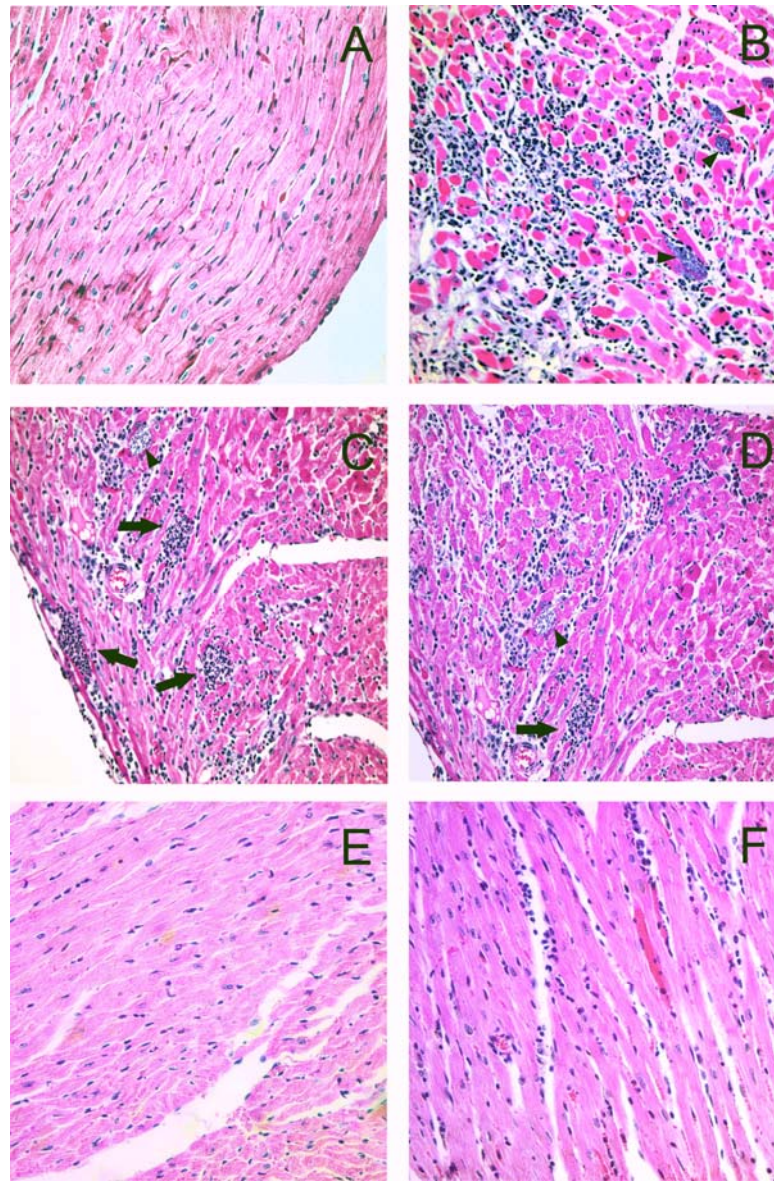
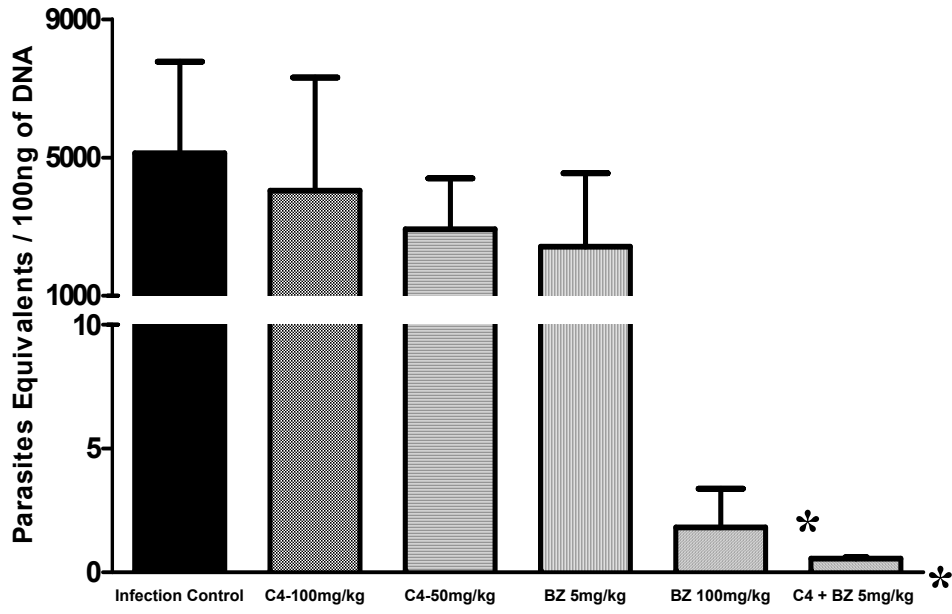


Figure 5



ANEXO B

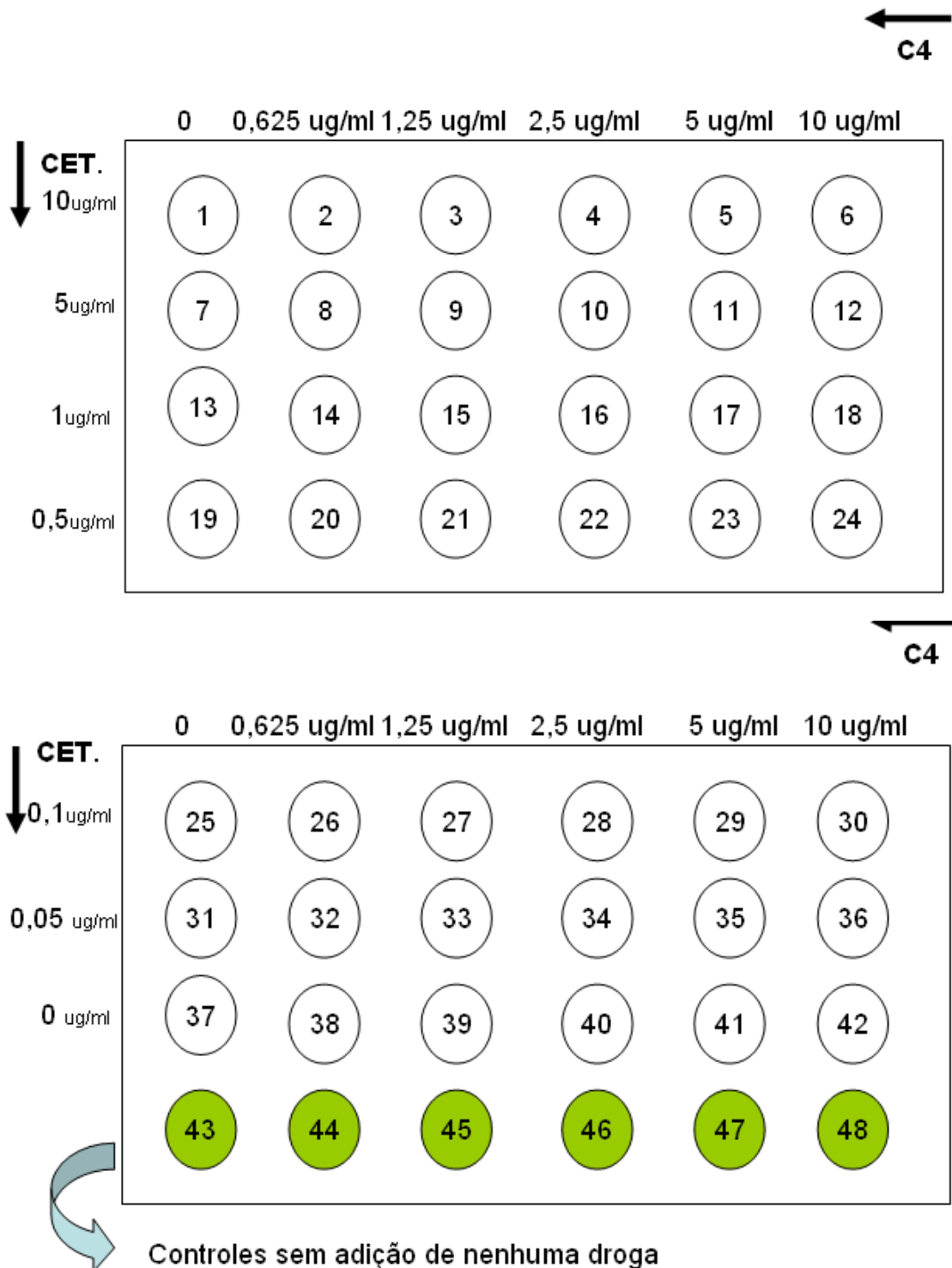
Protocolos

TÉCNICA DE CHECKERBOARD

É avaliado neste experimento a capacidade de uma determinada droga interagir com outro composto, e se esta interação potencializa a sua capacidade antimicrobiana. No presente protocolo é descrito a técnica usada para avaliar a capacidade de interação de dois compostos com potencial atividade tripanocida. Com o resultado obtido pode-se avaliar também se esta interação é antagônica ou indiferente. Pode-se avaliar a possível interação de duas substâncias sobre as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. Abaixo, segue a descrição do protocolo usado sobre formas epimastigotas.

O experimento é realizado em placa de 24 poços, na qual foram usadas formas epimastigotas em fase logarítmicas de crescimento, e na concentração de 10^6 células/ml. Em cada poço é depositado uma solução com volume de um ml, contendo o parasita, meio LIT, 10% de soro fetal bovino, e as drogas a serem testadas, isoladas ou em combinação. Para isso é realizada uma diluição seriada das drogas testadas (em tubos eppendorf) e o experimento deve ser repetido. É feita a contagem de cada poço em câmara de Neubauer, e os resultados obtidos são submetidos à técnica do *checkerboard* para analisar o efeito das combinações das drogas. Inicialmente deve ser calculado o IC_{50} de cada droga isoladamente, e após isso o IC_{50} das drogas em conjunto; após isto é calculado o FIC (concentração inibitória fracional) para cada droga. A somatória do valor de FIC equivale ao FICI (índice de concentração inibitória fracional). Quando a somatória destas frações é menor que 1 define-se como sinergismo, quando a somatório é igual a 1 defini-se como efeito aditivo e quando a somatória das frações é maior que 1 a combinação tem efeito antagônico (Chou, 2006).

Com os resultados, recomenda-se então a construção de isobogramas (gráficos em escala aritmética). Segue abaixo representação esquemática do experimento.



Cálculos do FIC e FICI:

Para a correta interpretação dos resultados é importante realizar o cálculo do FIC (concentração inibitória fracional) de cada droga e o FICI (índice de concentração inibitória fracional) que é a somatória dos valores de FIC, conforme exemplo abaixo:

$$\mathbf{FIC (A)} = IC_{50} \text{ da droga associada} / IC_{50} \text{ da droga isolada}$$

$$\mathbf{FIC (B)} = IC_{50} \text{ da droga associada} / IC_{50} \text{ da droga isolada}$$

$$\mathbf{FICI} = \mathbf{FIC \text{ droga (A)} + FIC \text{ droga (B)}}$$

Para a construção dos isobogramas, recomenda-se fazer um gráfico com as concentrações da droga de referência na abscissa e as concentrações na ordenada, e os pontos devem ser representativos do resultado do FICI. Sendo sinérgico, a curva torna-se côncava, e sendo antagônica, convexa.

PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

AVALIAÇÃO DE COMPOSTO CARBOLINICO SOBRE PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPA Y DE *T. cruzi*

- Os animais devem ser ambientados em biotério por no mínimo 48 h antes do início do tratamento.

- Tratamento:

O parâmetro para a escolha das concentrações dos compostos baseou-se na concentração para uso experimental *in vivo* do benznidazol, descrito na literatura como 100 mg/kg/dia (Araújo-Jorge & De Castro, 2000; Da Silva e cols. 2008). Sendo assim, para a escolha das concentrações do C4 optou-se em usar grupos de animais tratados com a mesma concentração (100 mg/kg/dia) e a metade desta (50 mg/kg/dia).

Na associação dos compostos, novamente levou-se em consideração a concentração usual do benznidazol; optou-se em usar uma concentração muito menor que a descrita acima (vinte vezes menor), 5 mg/kg/dia para os dois compostos, uma vez que a idéia era observar a possível atividade sinérgica em baixas concentrações (cogitando que o benznidazol em baixas concentrações apresentaria menos efeitos tóxicos característicos). Como controle do tratamento usou-se um grupo apenas testado com benznidazol a 5 mg/kg/dia. Usou-se ainda um grupo infectado, mas sem tratamento como controle da infecção.

- Concentrações usadas:

- C4 + benznidazol, 5 mg/kg/dia (para cada composto)
- Benznidazol, 5 mg/kg/dia
- Benznidazol, 100mg/kg/dia
- C4, 50 mg/kg/dia

- C4, 100 mg/kg/dia

1º Dia do Experimento

Dia da infecção:

- Dividir os animais nas respectivas gaiolas, (até 5 nas pequenas), foram usados camundongos BALB/c machos, e devem ser mantido em ciclos de 12 h de luz e 12 h de escuro.
- Marcar os animais com ácido pícrico na pelagem para identificação correta no período da contagem.
- Fazer a coleta do sangue de um animal previamente contaminado, contar as formas infectantes (método de Pizzi–Brener) e padronizar o inóculo (10^4 formas tripomastigotas).
- Infectar cada animal com $\pm 100 \mu\text{l}$ de sangue na concentração descrita acima, com excessão do grupo controle negativo.

Após 48 h

3º Dia (d.p.i - dia pós infecção)

Início do tratamento

- Faz-se a pesagem das drogas e respectiva diluição, usando DMSO e após água destilada, aquecer suavemente a suspensão do composto carbolínico, homogeneizar mecanicamente, até obter uma solução mais homogênea possível.

- Administração por gavagem, (via oral), 500 µl da solução na concentração de cada grupo, volumes superiores podem causar regurgitamento.
- Importante separar grupos controle negativo (sem infecção) e positivo (com infecção e sem tratamento).

3º Dia (d.p.i)

- Início da contagem pelo método Pizzi Brener,
- De maneira resumida: 5 µl de sangue coletado da cauda do animal infectado deve ser colocada gentilmente sobre uma lâmina e sobre esta gota coloca-se uma lamínula, e faz a contagem logo em seguida, caso não seja possível fazer a contagem imediatamente após a confecção da lâmina, deve colocar esta em uma câmara úmida (placa de Petri com algodão umedecido) até o momento da contagem,
- Contar 50 campos e anotar em uma planilha, em microscópio óptico (objetiva de 40x),
- Importante calcular o fator de correção do microscópio que será utilizado,
- Realizar a contagem todo dia até o 21º dpi,
- O tratamento foi realizado diariamente, nas concentrações previamente calculadas,
- Pesar os animais a cada três dias, até o dia do sacrifício.

No 21º d.p.i, é feito o sacrifício dos animais, por deslocamento cervical ou em câmara de CO₂ (mais apropriado) e coletados os órgãos que se quer avaliar (coração, baço, fígado, etc.).

Os órgãos devem ser lavados em PBS, desidratados em concentrações crescentes de etanol e fixados em solução de BOUIN.

Após o processo de fixação, os órgãos são emblocados em parafina, em seguida são realizados cortes de 3 μm de espessura em micrótomo, para confecção de lâminas que posteriormente são submetidas a coloração de hematoxilina-eosina (HE). Após a coloração tornar as lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. Finalmente após secagem é feita observação em microscópio óptico (em objetiva de 40X).

OBS. Um experimento piloto foi realizado a fim de observar a solubilidade dos compostos em diferentes solventes. Neste mesmo experimento foi usado um grupo experimental de animais sem infecção e tratados apenas com o veículo (DMSO 1% e água destilada), a fim de avaliar se o veículo teria alguma interferência na parasitemia ou toxicidade sobre os animais. Estas duas possibilidades não foram evidenciadas.

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *T. CRUZI* EM TECIDO CARDÍACO USANDO TÉCNICA DE RT-qPCR

Com objetivo de identificar e quantificar a presença do protozoário *Trypanosoma cruzi* no tecido cardíaco de camundongos infectados experimentalmente e tratados com diferentes concentrações de benznidazol e composto carbolínico, estes animais foram sacrificados, sendo retirados seus corações, que foram pesados e lavados em PBS.

As amostras foram submetidas a processo de retirada de proteínas contaminantes, com tampão de lise (Tris-HCl, EDTA, SDS) e proteinase K.

Os corações foram triturados e homogeneizados mecanicamente (Ultra Stirrer, Scientific SDN – Malásia). O DNA do parasita foi extraído por meio de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.

A PCR em tempo real foi realizado com marcador de fluorescência SYBR GREEN com 100 ng de DNA total, onde se buscou a amplificação de sequências específicas de *T. cruzi* (Cummings & Tarleton 2003) em um termociclador Corbett Rotor Gene[®].

Com o resultado obtido foi feita uma curva padrão usando como base a amplificação de células sem tratamento (controle), e posterior comparação dos grupos tratados com a curva.

PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DE POTENCIAL
TRANSMEMBRÂNICO, POR CITOMETRIA DE FLUXO COM RODAMINA 123

Após o tratamento com o composto carbolínico, as formas epimastigotas e tripomastigotas foram incubadas com 5 µg/ml rodamina 123 (Rh123) por 15 min a 37 °C a fim de se verificar o potencial da membrana mitocondrial. Após este período, as células foram lavadas com PBS uma vez, e ressuspensas novamente com PBS, e incubadas por mais 30 min a 37 °C até a análise. A aquisição de dados e a análise foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, E.U.A.) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, E.U.A.). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasita. 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 parasitas tratados e MC para o controle de parasitas. Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial. Após estes cálculos pelo *software*, foram montados os histogramas respectivos.

Materiais:

- Ponteiras
- Eppendorf
- Tubo para citometria
- PBS
- Rodamina 123 (5 mg/ml em etanol)
- Antimicina A (1 mg/ml em etanol) Controle Positivo.

Procedimento:

- 1- Após o tratamento, lavar as células 3 x com PBS
- 2- Ressuspender 1×10^6 cel/ml em 1 ml de PBS
- 3- Adicionar 1 μ l da solução estoque de rodamina 123
- 4- Incubar por 15 min a 37 °C
- 5- Lavar as células uma vez com PBS
- 6- Ressuspender em 500 μ l de PBS e incubar por 30 min a 37 °C
- 7- Realizar leitura no citômetro, imediatamente após a incubação

OBS- Em uma alíquota de células controle (sem tratamento), após a marcação por 15 min com rodamina 123, lavar com PBS conforme descrito (uma vez) e adicionar 0,5 μ l de antimicina A aos 500 μ l de PBS (A antimicina A é uma droga cujo mecanismo de ação leva ao colapso do potencial de membrana mitocondrial, portanto funciona como um controle positivo). Incubar por 30 min, lavar uma vez e proceder à leitura.

- Rodamina é excitável por *laser* argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (**FL1**):

PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR, POR CITOMETRIA DE FLUXO COM IODETO DE PROPÍDIO

As amostras de *T. cruzi*, epimastigotas e tripomastigotas, foram previamente tratadas com o composto carbolínico por 96 h e 2 h respectivamente. Após este período, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes, em seguida foram ressuspensas 5×10^6 células em 500 μ l de PBS. Após este procedimento, foi adicionado 50 μ l de uma solução de iodeto de propídio a 2 μ g/ml por cinco minutos à temperatura ambiente. Imediatamente após a incubação, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, E.U.A.) equipado com o *software* CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, E.U.A.). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida com o parasita. O iodeto de propídio é excitável por *laser* de argônio, e emite fluorescência na faixa dos 560-580 nm (FL2).

As células com membrana íntegra não permitem a entrada do iodeto de propídio, portanto apresentarão baixa fluorescência. Células cuja membrana esteja rompida ou seriamente danificada permitirão a entrada do marcador de fluorescência, que se ligará ao DNA emitindo alta fluorescência quando excitada por *laser*.

OBS - No caso de *T. cruzi*, para a forma epimastigota o controle positivo foi obtido tratando-se uma alíquota de células sem o tratamento com o carbolínico, com soro humano fresco, por 5 min. Após este período, este grupo de células foi submetido ao mesmo procedimento de marcação com iodeto de propídio aplicado ao grupo tratado previamente com carbolínico.

Materiais:

- Ponteiras
- Eppendorf
- Tubo para citometria
- PBS
- Iodeto de propídio (2 $\mu\text{g/ml}$ em PBS)
- Soro humano fresco como controle positivo para as formas epimastigotas.

DETECÇÃO DE COMPARTIMENTOS ACÍDICOS

A fim de avaliar a presença de compostos acídicos, foi realizada a marcação com o marcador fluorescente laranja de acridina. Após o tratamento com o composto carbolínico, foram lavadas em meio LIT duas vezes e incubadas na presença de 30 µg/ml de laranja de acridina por 30 min a 28 °C protegido da luz. Após este período, as células são lavadas 3 vezes em meio LIT. Como controle, foram usadas células sem tratamento prévio com o composto carbolínico.

As células foram aderidas em lâmina e lamínula tratada com poli-L-lisina, adicionado *n*-propil-galato 10% e seladas com esmalte incolor, sem estarem fixadas. A observação foi feita em microscópio de fluorescência Zeiss® e as imagens capturadas com o *software* AxioVision 4.0®, com filtro de excitação de 514 nm.

Laranja de Acridina:

- Solução *Stock*: 100 µg/ml em PBS
- Solução de uso: 30 µg/ml
- Lavar células em meio LIT
- Observação das células vivas ou fixadas em paraformaldeído 4%
- Montagem das lâminas com *n*-propil-galato 10% ou glicerol.
- Observar em microscópio de fluorescência em filtro de emissão 514 nm
- Durante todo o processo é recomendável proteger a amostra da luz.

DETECÇÃO DE AUTOFAGOSSOMOS

Com o objetivo de observar a presença de vacúolos autofagossomos, foi realizada a marcação com modansil-cadaverina, após crescimento celular de formas epimastigotas.

- Lavar as células 3 vezes com PBS gelado: 10000 rpm / 3min. cada vez
- Ressuspender o *pellet* em 0.05 mM de MDC (solução estoque – 5mM – diluição 1:100)
- Incubar por 10 min. protegido da luz/37° C.
- Lavar duas vezes com PBS gelado.
- Observar ao microscópio de fluorescência (*excitation wavelength* 380 nm, *emission filter* 525 nm).

OBS. Como controle positivo, foi utilizado um grupo de células crescidas em meio LIT sem adição de soro fetal bovino, simulando um estresse nutricional.

ANEXO C

Resultados complementares

Ao longo do período de doutorado, outros experimentos foram realizados na tentativa de compreender melhor a ação do composto carbolínico no protozoário *T. cruzi*. Estes dados, até o presente momento, não resultaram em um segundo artigo completo, contudo, mais experimentos complementares estão em andamento com a finalidade de completar esta etapa do estudo.

1 ESTUDOS COM CITOMETRIA DE FLUXO

Uma vez que em estudos anteriores de nosso grupo verificamos que o composto carbolínico possuía atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*, o objetivo destes estudos foi observar e compreender melhor a forma como este composto químico realizava sua atividade antiparasitária, ou seja, buscamos compreender de forma inicial o mecanismo de ação desta substância sobre formas epimastigotas e tripomastigotas.

Em trabalho publicado em 2009 (Valdez e cols., 2009) demonstramos por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão que formas epimastigotas de *T. cruzi* quando tratadas com diferentes concentrações de composto carbolínico exibiam mitocôndrias alteradas morfologicamente, apresentando um aumento de tamanho bem como um arredondamento de sua estrutura. Com a utilização do citômetro de fluxo objetivamos avaliar a funcionalidade da mitocôndria dos parasitas tratados com o carbolínico, através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial usando o marcador Rodamina 123. Foi usado também o marcador Iodeto de Propídio a fim de avaliar possíveis alterações na membrana celular do parasita.

As formas epimastigotas, foram tratadas com o valor de IC₅₀ (7,0 µg/ml) e IC₉₀ (30 µg/ml) por 96 h e as formas tripomastigotas nas concentrações do EC₅₀ (45 µg/ml) e EC₉₀ (90 µg/ml) por 2 h. Após este período, foram tratadas com o marcador de fluorescência Rodamina 123. Em experimento independente foi feito o mesmo pré-tratamento com o composto teste e as células marcadas com Iodeto de Propídio. Em ambos os casos, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, FACS Calibur[®], Becton Dickinson.

Os resultados obtidos com a marcação com Rodamina 123 indicaram uma despolarização da membrana mitocondrial em ambas as formas evolutivas do parasita e nas

duas concentrações testadas (Figura 1 e Figura 2). Indicando algum dano na integridade da mitocôndria. Já no caso da marcação com o Iodeto de Propídio, não foram observadas alterações em epimastigotas nem em tripomastigotas em nenhuma das concentrações testadas (Figura 3 e Figura 4), indicando assim que a integridade da membrana celular ficou preservada.

Levando em conta os resultados obtidos, é possível concluir que a atividade tripanocida do composto carbolínico pode estar relacionada com uma ação direta sobre a mitocôndria, levando em consequência disto à morte celular. Esta atividade, entretanto parece não estar relacionada com alguma alteração na membrana celular. Contudo, estudos adicionais são necessários a fim de elucidar com maior riqueza de detalhes o mecanismo de ação do composto carbolínico sobre as três formas evolutivas do *T. cruzi*.

Figura 1 - Análise de formas epimastigotas tratadas com composto carbolínico (por 96 horas) e marcadas com Rodamina 123.

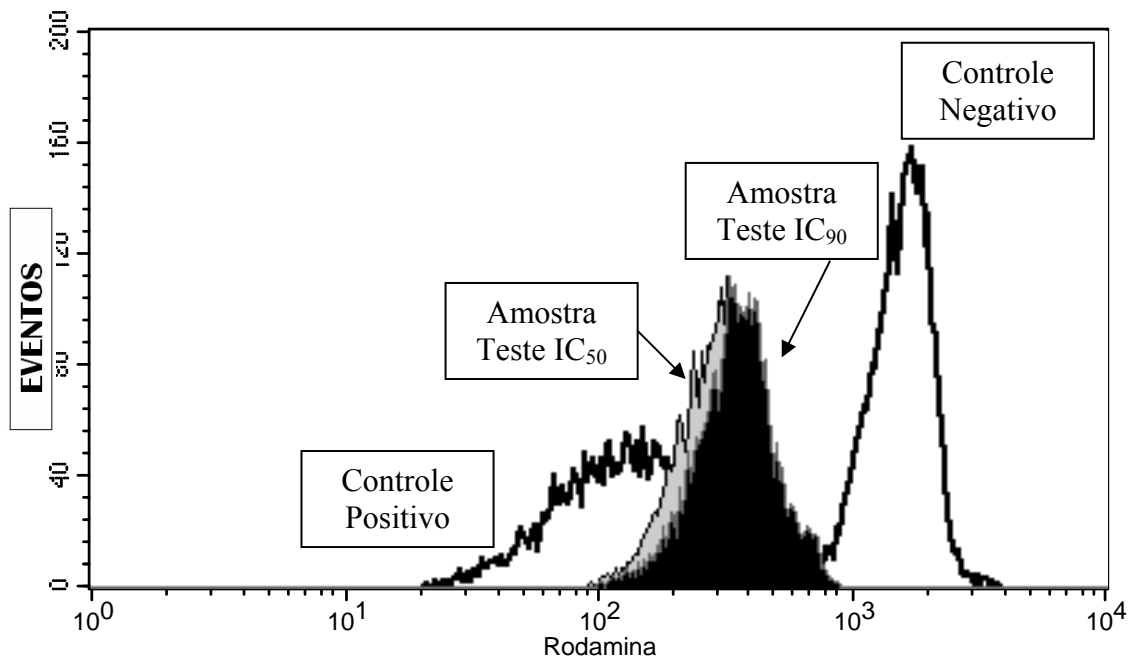


Figura 2 - Análise de formas tripoamastigotas tratadas com composto carbolínico (por 2 horas) e marcadas com Rodamina 123.

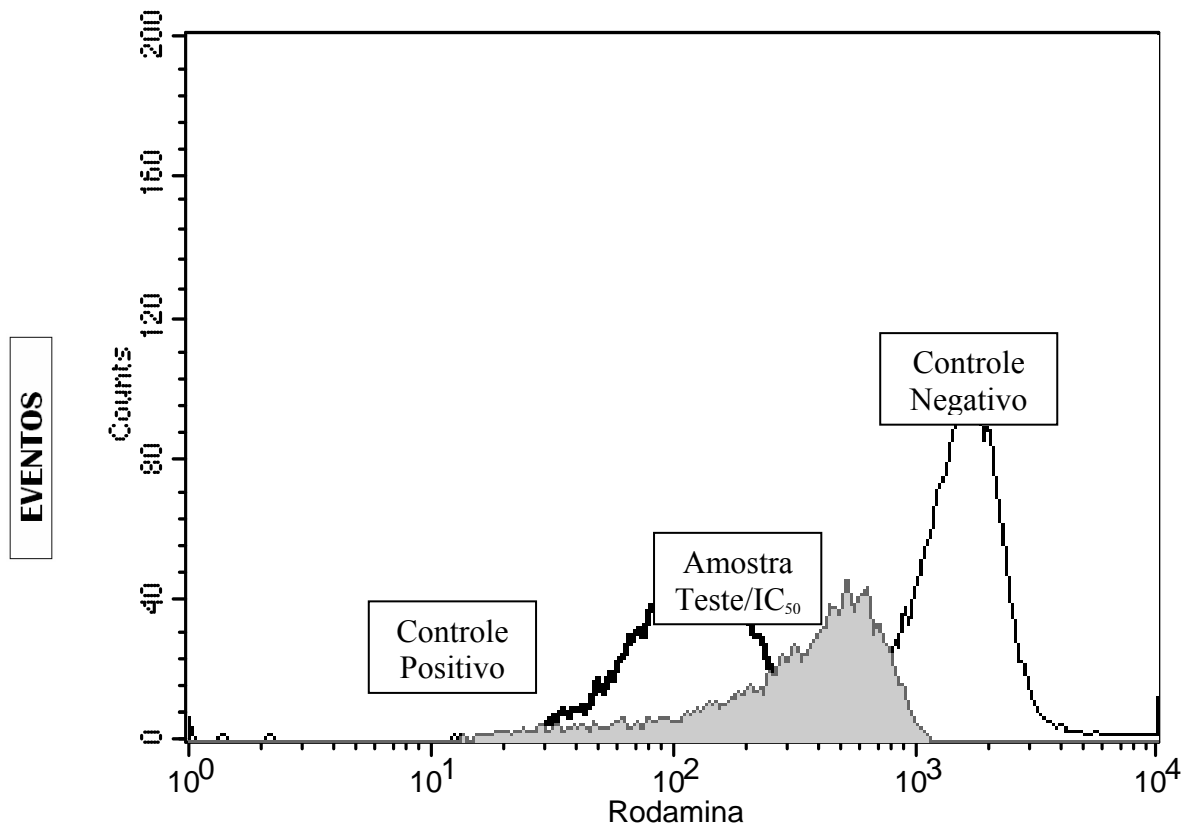


Figura 3 - Análise de formas epimastigotas tratadas com composto carbolínico (por 96 horas) e marcadas com Iodeto de Propídio.

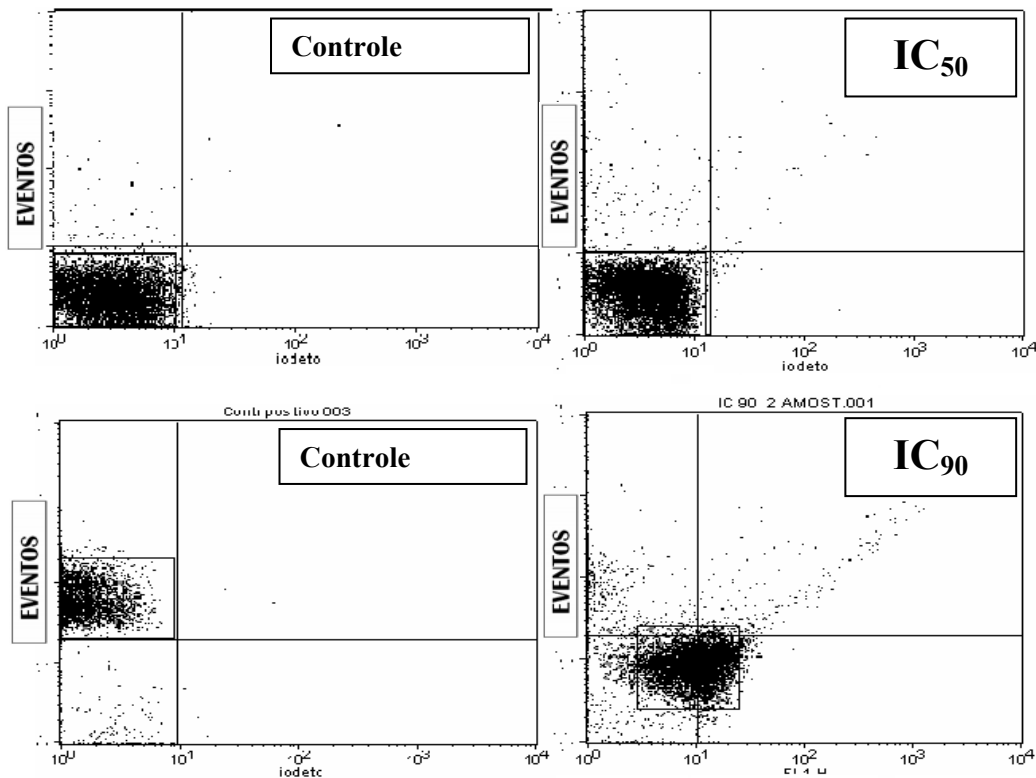
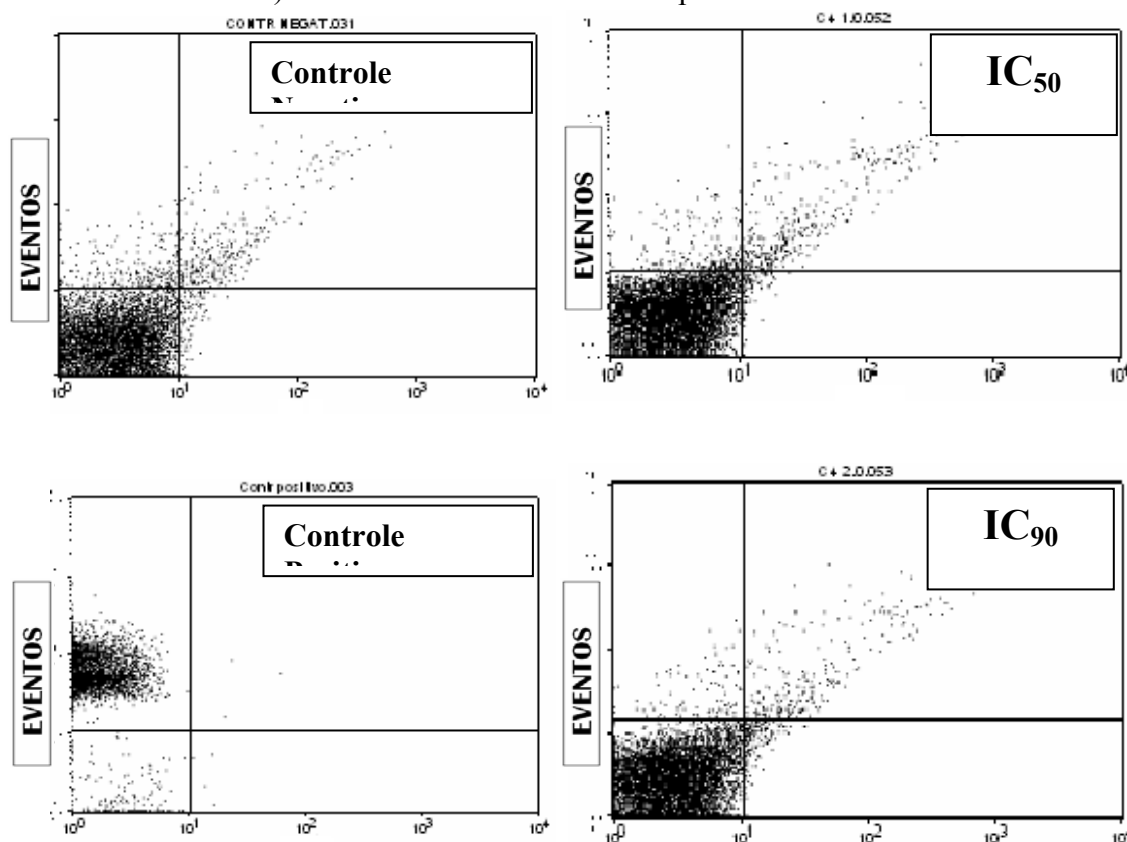


Figura 4 - Análise de formas tripomastigotas tratadas com composto carbolínico (por 2 horas) e marcadas com Iodeto de Propídio.



As Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* possuem uma organela característica localizada na região posterior do protozoário e encontrada apenas nesta forma evolutiva, chamada de reservossomo (Soares & De Souza, 1988). Esta é uma organela relativamente grande medindo 0,4 – 0,6 μm de diâmetro (Sant’Anna e cols. 2004). Em estudo pioneiro sobre o reservossomo Soares e cols. (1992) demonstraram que macromoléculas absorvidas pela célula seriam armazenadas neste compartimento, sendo então classificados como estruturas pré lisossomais, e assim como outras estruturas endocíticas o reservossomo possui pH interno baixo (aproximadamente 6,0). Esta organela possui em seu interior inclusões lipídicas e armazena uma cisteína proteínase chamada cruzipaina, a qual é um importante fator na diferenciação celular e é considerado um essencial fator de virulência do *T. cruzi* (De Souza, 2002).

Com o objetivo de avaliar a interferência do composto carbolínico nesta importante organela da forma epimastigota do *T. cruzi*, realizou-se a detecção de compartimentos ácidos (reservossomos) com a marcação de um marcador de fluorescência que tem afinidade por compartimentos ácidos, chamado laranja de acridina, e posterior observação em microscópio de fluorescência.

As formas epimastigotas foram pré tratadas com a concentração de IC₅₀ (7,0 µg/ml) e IC₉₀ (30 µg/ml) por 96 h e posteriormente marcadas com laranja de acridina na concentração de 30 µg/ml; paralelamente células sem o pré tratamento também foram submetidas à marcação com laranja de acridina, a fim de servirem como células controle. Após o tempo de marcação, e posterior lavagem das células, foram observadas vivas (não fixadas) em lâminas aderidas com Poli-L-lisina, em microscópio de fluorescência Zeiss[®], e utilizando o *software* AxioVision 4.0[®] em que a coloração laranja indica pH ácido e coloração verde indica pH neutro. Somado a isto, foi realizada a quantificação por contagem visual, sendo que 100 células de cada grupo foram observadas em microscópio de fluorescência e quantificadas as células que apresentaram fluorescência. O resultado obtido foi organizado em gráfico como média de três experimentos independentes.

O resultado observado foi um aumento considerável na presença de estruturas marcadas em laranja nas células tratadas tanto com IC₅₀ quanto com IC₉₀, porém na concentração de IC₅₀ houve uma diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$). Nas células sem tratamento com o composto carbolínico (controle) também foi possível observar a presença de estruturas marcadas em laranja (pH ácido), porém com menor intensidade (Figura 5). Na quantificação, o grupo que apresentou o maior número de células marcadas foi o tratado com IC₅₀ (69,66 ± 6,02 células apresentaram alguma marcação, enquanto nas tratadas com IC₉₀ 51,34 ± 4,50 células foram marcadas; no grupo controle apenas 41 ± 3,61 células apresentaram alguma marcação) (Figura 6).

Os resultados obtidos com a marcação de laranja de acridina sugerem que as formas epimastigotas de *T. cruzi* quando tratadas com o composto carbolínico apresentam um maior número de reservossomos, notadamente quando tratadas com a concentração de IC₅₀. Pode-se concluir que, uma vez que os reservossomos são estruturas que participam da via endocítica de macromoléculas, de alguma forma as células expostas ao carbolínico produziram mais reservossomos, sendo talvez uma resposta a este estímulo químico, porém estudos complementares são necessários para confirmar estes dados e indicar se este possível aumento está relacionado diretamente com a capacidade tripanocida do composto carbolínico.

Figura 8 - Formas epimastigotas marcadas com laranja de acridina 30 $\mu\text{g/ml}$. A e B células sem prévio tratamento com composto carbolínico (controle), C e D células previamente tratadas com o valor de IC_{50} (7,0 $\mu\text{g/ml}$) do composto carbolínico e E e F células previamente tratadas com a concentração do IC_{90} (30 $\mu\text{g/ml}$) do composto carbolínico.

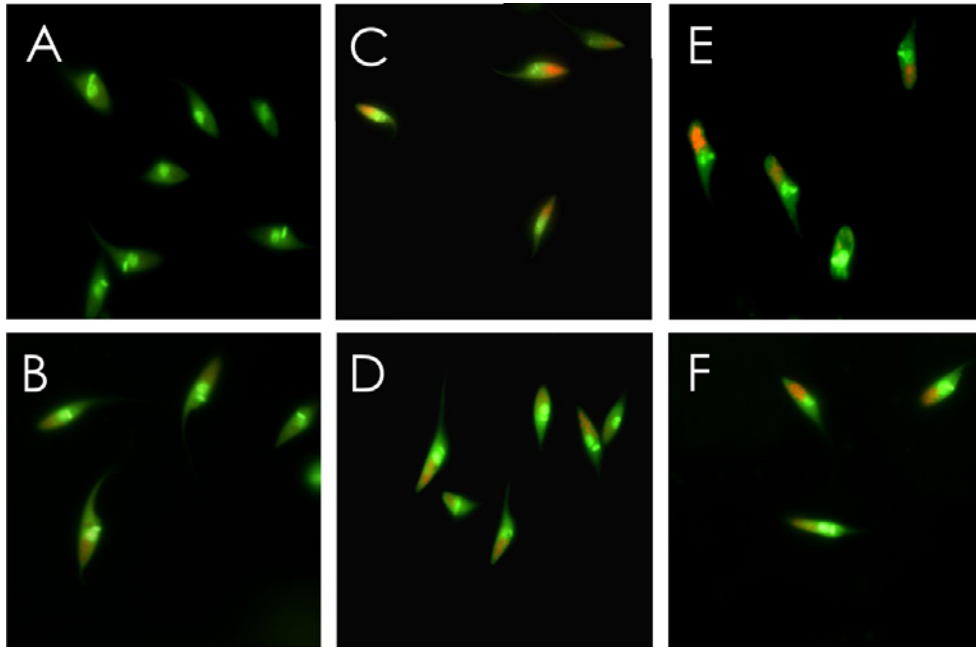
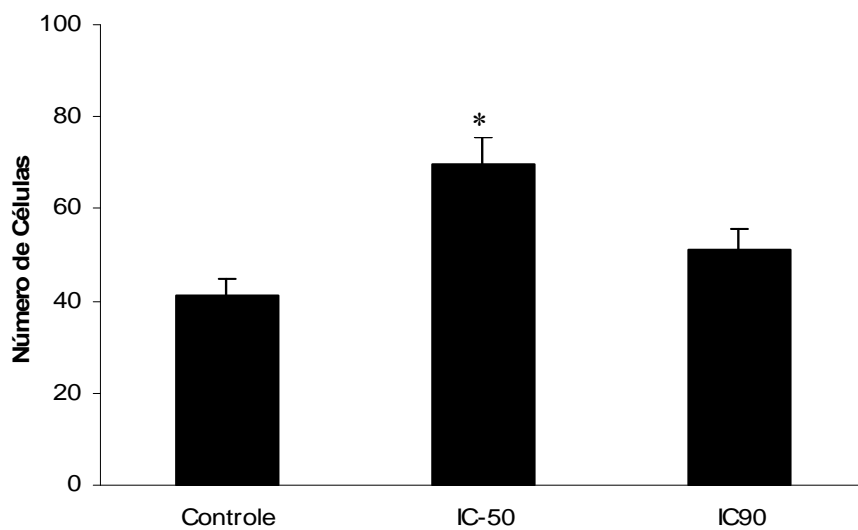


Figura 9 - Avaliação da contagem realizada em 100 células de cada grupo, as barras indicam o número de células com a presença de marcação com laranja de acridina. Asterisco indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).



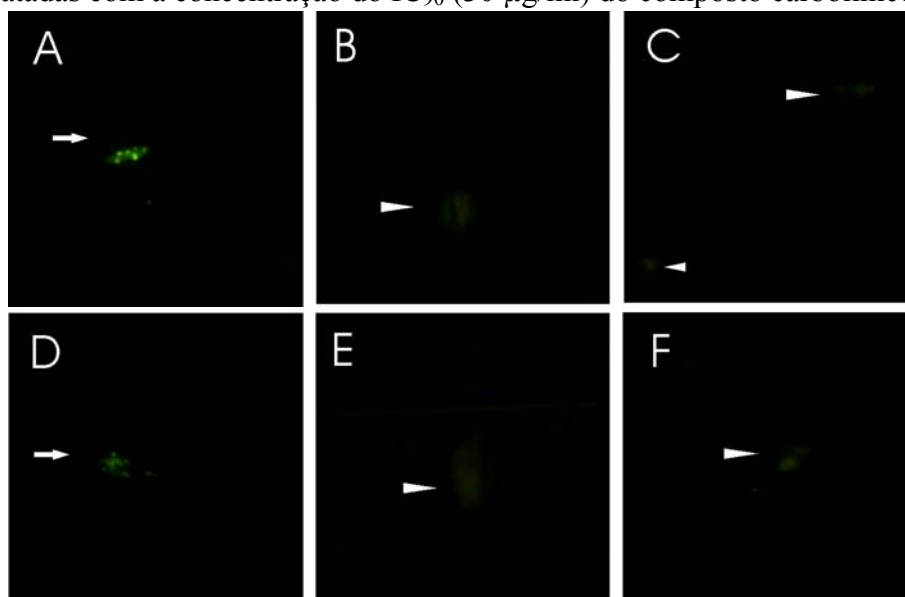
3 DETECÇÃO DE VACÚOLOS AUTOFAGOSSOMO

A autofagia é um processo de destruição celular, no qual a própria célula promove a destruição de partes celulares e que pode ser induzido por estímulos externos. Durante este processo, porções da célula como organelas e complexos protéicos são envolvidos por vesículas membranosas de origem ainda desconhecida. Estas vesículas são denominadas de autofagossomos e este após englobar a partícula se une a lisossomos da célula causando, então, a degradação da partícula (Rigden e cols., 2005).

Em trabalho anterior verificamos em microscopia eletrônica de transmissão uma intensa vacuolização de formas epimastigotas após sofrerem tratamento com o composto carbolínico. Então, como a principal característica do processo descrito acima é a presença destes autofagossomos, formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com composto carbolínico IC₅₀ (7.0 µg/ml) e IC₉₀ (30 µg/ml) foram submetidas à marcação com monodansil-cadaverina, que é um marcador de fluorescência específico para os vacúolos autofagossomos. Como controle positivo, formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT sem adição de soro fetal bovino, sendo induzido um estresse nutricional (Jimenez e cols., 2008).

O resultado observado foi que as células tratadas com as diferentes concentrações de carbolínico não apresentaram vacúolos marcados, sendo que nas células controle foi possível observar vacúolos apresentando marcação.

Figura 10 - Formas epimastigotas marcadas com monodansil-cadaverina 0,05 mM. A e D: células sem prévio tratamento com composto carbolínico e crescidas sob estresse nutricional (controle positivo); B e E: células previamente tratadas com o valor de IC₅₀ (7,0 µg/ml) do composto carbolínico; C e F: células tratadas previamente tratadas com a concentração do IC₉₀ (30 µg/ml) do composto carbolínico.



CONCLUSÃO

Diversos são os relatos na literatura demonstrando substâncias com alguma atividade tripanocida, sendo estas das mais diferentes fontes, naturais ou sintéticas. Com experimentos realizados *in vitro* ou *in vivo* diversos autores sugerem novos compostos como alternativas para o tratamento da doença de Chagas.

Porém o fato é que, até o presente momento não existe nenhuma substância que possa substituir o benznidazol como agente de escolha para o tratamento da doença de Chagas. Após 102 anos de sua descoberta, esta patologia possui um arsenal terapêutico limitado, pouco efetivo e tóxico. Somado a este alarmante quadro, o fato de não existirem vacinas para prevenir universalmente a transmissão desta doença, agrava a condição de milhões de pessoas que vivem em áreas de risco de transmissão. Todas localizadas no continente americano.

Em função disto, torna-se imperativo que novos e modernos fármacos sejam desenvolvidos, e todo o esforço em pesquisa e desenvolvimento destes é plenamente justificado. Neste contexto destacam-se os compostos carbolínicos, que em trabalho anterior de nosso grupo já haviam demonstrado promissora atividade tripanocida e pouca toxicidade, ambos demonstrados em experimentos *in vitro*. No presente trabalho, reiteramos a capacidade antiparasitária e baixa toxicidade desta substância, porém desta vez em experimentos *in vivo*, nos quais um composto carbolínico foi submetido à complexidade de um modelo animal, em que propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas satisfatórias são exigidas. Os resultados obtidos sugerem que o composto carbolínico teve uma boa absorção, distribuição e metabolização. Prova disto foi que os grupos tratados apenas com o carbolínico tiveram um índice de parasitemia menor que o grupo infectado e não tratado, e uma sobrevida maior no número de animais. Outro ponto a ser destacado é a via de administração, ou seja, via oral. O composto carbolínico foi absorvido pelo trato gastrointestinal, resistindo a barreiras químicas e bioquímicas, como o baixo pH estomacal e enzimas gástricas.

Obteve-se um resultado mais interessante ainda quando a droga teste foi associada em baixa concentração com o benznidazol, também em baixa concentração (20 vezes menor que a concentração padrão), e neste grupo os resultados foram ainda melhores com uma sobrevida de todos os animais infectados e uma baixíssima parasitemia, indicando que estas duas substâncias possuem uma capacidade sinérgica entre elas.

Esta associação foi classificada como sinergismo de fato após testes *in vitro* específicos para este fim (*checkerboard*), no qual apresentaram um índice de concentração inibitória fraccional abaixo de 1, sendo então confirmado o sinergismo.

Os resultados podem ser considerados animadores e indicam fortemente que o composto carbolínico C4 é um ótimo agente tripanocida, que tem potencial para ser avaliado em testes clínicos com pacientes chagásicos. Contudo, novas pesquisas e análises deste composto tornam-se necessárias para maior compreensão do seu mecanismo de ação e atividade tóxica em longo prazo, bem como desenvolver novas formulações que contenham este composto, ou ainda novos esquemas terapêuticos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Sabe-se que o tratamento atual da doença de Chagas é limitado e parcialmente eficaz. Limitado porque existe apenas um medicamento de escolha no Brasil, o benznidazol, e a pouca eficiência se deve basicamente aos inúmeros efeitos adversos que esse medicamento apresenta, somado a isto a variação na susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi*, ao benznidazol, transformam a doença de Chagas em um grande problema de saúde pública na América Latina.

Nesse contexto são necessários novos agentes tripanocidas, que possuam uma atividade eficiente sobre o parasita e baixa toxicidade ao paciente. Levando em consideração os interessantes resultados obtidos na associação *in vitro* e *in vivo* do composto carbolínico com benznidazol em baixas concentrações, pode-se afirmar que o composto carbolínico apresenta-se como promissor agente terapêutico. A opção de testar uma substância experimental com uma droga padrão, em baixas concentrações, explica-se como uma abordagem racional, pois o benznidazol já é um fármaco produzido em larga escala e conhece-se bem sua farmacocinética e farmacodinâmica, e uma vez associado ao composto carbolínico teve sua ação tripanocida potencializada e pode-se especular que, por estar em baixa concentração estaria causando menos efeitos colaterais. Esta afirmação, contudo, necessita de estudos complementares, onde se avalie a toxicidade crônica, toxicidade aguda, bem como o potencial genotóxico. Torna-se importante também compreender melhor o mecanismo de ação do composto carbolínico isolado e quando associado ao benznidazol.

Entretanto os resultados obtidos podem ser considerados animadores, e incentivam estudos complementares *in vitro* e *in vivo* (em modelos animais), e posteriormente avaliar a atividade destes compostos em ensaios clínicos em seres humanos, bem como observar o efeito deste composto frente a diversidade de linhagens de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO-JORGE, T. C.; DE CASTRO, S. L. 2000. *Doença de Chagas, Manual de Experimentação Animal*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- CHOU, T.C. 2006. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computadorized Simulation of Synergism and Atagonism in drug Combination Studies. *Pharmacology Review*. 58:621-681.
- CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. 2003. Rapid Quantification of *Trypanosoma cruzi* in Host Tissue by Real-Time PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 129:53-59.
- DA SILVA, C. F.; BATISTA, M. M.; BATISTA, D. G. J.; DE SOUZA, E. M.; DA SILVA, P.B.; OLIVEIRA, G. M.; MEUSER, A. S.; SHAREEF, A. R.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. 2008. *In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Trypanocidal Activity of a Diarylthiophene Diamidine Against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 52(9):3307-3314.
- DE SOUZA, W. 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutal Design*, 8: 269-285.
- JIMENEZ, V.; PAREDES, S.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. 2008. Natural Programmed Cell Death in *T. cruzi* Epimastigotes Maintained in Axenic Cultures. *Journal of Cellular Biochemistry*. 105(3): 688-698.
- RIGDEN, D. J.; HERMAN, M.; GILLIES, S.; MICHELS, P.A.M. 2005. Implications of a Genomic Search for Autophagy-Related Genes in Trypanosomatids. *Biochemical Society Transactions*. 33(5):972-974.
- SANT'ANNA, C., DE SOUZA, W, CUNHA E SILVA, N. 2004. Biogenesis of the Reserosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, 10: 637-646.
- SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. 1988. Cytoplasmic Organelles of Trypanosomatids: a Cytochemical and Stereological Study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 20(2):349-361.
- SOARES, M. J.; PADRÓN, T. S.; SOUZA, W. 1992. Identification of a Large Pre-Lysosomal Compartment in the Pathogenic Protozoon *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science*. 102: 157-167.
- VALDEZ, R.H.; TONIN-DUSMAN, L.T.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; MORGADO-DIAZ, J.A.; SARRAGIOTTO, M.A.; NAKAMURA, C.V.; 2009. Biological Activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide Against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 110:7-14.