

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Felipe Figueirôa Moreira

Efeitos anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* de novos compostos
metalocomplexos

Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil

Fevereiro de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

Felipe Figueirôa Moreira

Efeitos anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* de novos compostos
metalocomplexos

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestrado em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Dr^o Sergio Henrique Seabra
Co-orientadora: Dr^a Juliana de Araujo Portes

Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil
Fevereiro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas Elaborada com os dados
fornecidos pelo autor.

M838 Moreira, Felipe Figueiroa.

EFEITOS ANTI- *Trypanosoma cruzi* *IN VITRO* DE NOVOS COMPOSTOS
METALOCOMPLEXOS. / Felipe Figueiroa Moreira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

57 f. : il.

Bibliografia: 38 - 46.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.
Orientador: Sergio Henrique Seabra.

1. Doença de Chagas. 2. Metalocomplexos. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

EFEITOS ANTI-*Trypanosoma cruzi* IN VITRO DE NOVOS COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS

Felipe Figueirôa Moreira

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestrado em Biociências e Biotecnologia

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019

Comissão Examinadora

Prof. Dr^o. Thiago Alves Teixeira dos Santos

Prof. Dr^o. Clóvis de Paula Santos

Prof. Dr^o. Jorge Hudson Petretski

Prof. Dr^a. Juliana de Araujo Portes
(Co-orientadora)

Prof. Dr^o. Sergio Henrique Seabra
(Orientador)

“Cada pessoa é aquilo que crê, fala o que gosta, retém o que procura, ensina o que aprende, tem o que dá e vale o que faz.”

(Francisco Cândido Xavier)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades.

À minha família, amigos e namorada por toda ajuda e confiança, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões desde sempre, pelos cuidados e por acreditarem na minha capacidade, por entenderem meus horários incertos e por todo amor dispensado a mim. Ninguém é nada se não tiver uma boa base sólida o suficiente para que lhe sirva de alicerce.

À todos os professores que tive ao longo de minha vida acadêmica, por uma formação de qualidade, apesar de tantas dificuldades enfrentadas pela instituição. Sempre solícitos a ensinar e nos passar o máximo de conhecimento. Vocês são e sempre serão exemplos.

Ao professor Sergio Henrique Seabra pelo esforço e dedicação conferidos a manter os nossos laboratórios de pesquisa, mesmo em tempos difíceis. E como seu aluno, agradeço pela oportunidade confiada e pela experiência adquirida.

À minha co-orientadora Juliana de Araujo Portes por me dar a oportunidade de ingressar no meio científico, por ter paciência e me ensinar muito do que sei hoje, agradeço ainda por outros ensinamentos, muitas vezes involuntários, que poderiam passar despercebidos e levarei para minha vida. Quero um dia poder ser tão dedicado e competente quanto você.

Ao professor Renato Augusto DaMatta, por todo o auxílio em todas as etapas, por estar presente mesmo se desdobrando dentre tantas tarefas. Por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, obrigado.

Gostaria também de agradecer a todos os integrantes e companheiros de bancada do Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia e do Laboratório de Tecnologia em Cultura de Células da UEZO, e do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF, grandes profissionais que me ensinaram a ser crítico, competente e a fazer ciência de qualidade. Além de tornarem agradável o convívio no ambiente de trabalho e estarem, sempre que possível, dispostos a me ajudar, isso faz a diferença.

À UENF, UEZO, FAPERJ, CNPq e CAPES pelo suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada, cujo o agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, e é um grande problema de saúde pública na América Latina afetando aproximadamente 18 milhões de indivíduos e cerca de 60 milhões vivem sob risco de contaminação. A terapia disponível para esta doença baseia-se em dois fármacos, Nifurtimox e Benznidazol, que apresentam efeitos secundários graves, incluindo resistência, ineficiência na fase crônica da doença, efeitos citotóxicos graves e eficácia variável. Portanto, é urgente e essencial o desenvolvimento de novas terapias. Os metalocomplexos são compostos com núcleo metálico que podem ser coordenados a ligantes orgânicos potencializando sua atividade. Os metais de transição oferecem vantagens quando comparados a outros fármacos comuns baseados em compostos orgânicos, pois os metais possuem diferentes possibilidades de coordenação e geometria com o ligante de interesse, que é o fármaco, e também com as moléculas biológicas. Os metalocomplexos podem ser uma alternativa interessante para a terapia antiparasitária, pois já se mostraram ativos contra *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. Neste trabalho, avaliamos o efeito *in vitro* de dois metalocomplexos sobre o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os parasitos foram tratados com os compostos em concentrações que variaram de 1 a 100 nM e seu crescimento após tratamento foi quantificado. O composto I apresentou um valor IC₅₀ de 97.71 nM e 147.53 nM, após 3 e 5 dias de tratamento, respectivamente. O composto II apresentou um valor IC₅₀ de 122.76 nM e 104.17 nM para os mesmos tempos de tratamento. Análise ultraestrutural dos parasitos após o tratamento com os compostos mostrou que as mitocôndrias do parasito apresentam alterações em suas cristas, com inchaço e disposição anormal em torno do cinetoplasto, além de lesões nos reservossomos e formação de cristais em seu interior. Além disso, o tratamento com ambos os compostos causou perda no potencial de membrana mitocondrial de até 66% dos parasitos. Estes compostos foram ativos contra epimastigotas de *T. cruzi* apresentando valores de IC₅₀ na faixa de nanomolar e afetando as mitocôndrias e os reservossomos, organelas essenciais para a sobrevivência do parasito.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Metalocomplexos. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected tropical disease whose etiological agent is *Trypanosoma cruzi* and is a major public health problem in Latin America affecting approximately 18 million individuals and about 60 million live at risk of contamination. The available therapy for this disease is based on two drugs, Nifurtimox and Benznidazole, that exhibit severe side effects, including resistance, inefficiency in the chronic phase of the disease, severe cytotoxic effects and variable efficacy. Therefore, the development of new therapies is urgent and essential. The metallocomplexes are compounds with metal nuclei that can be coordinated to organic ligands potentializing their activity. Transition metals offer more advantages when compared to other ordinary drugs based on organic compounds, because the metals have different possibilities of coordination and geometry with the ligand of interest, which is the drug and also with the biological molecules. Metallocomplexes may be an interesting alternative for antiparasitic therapy, since they have already been active against *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. In this work, we evaluated the *in vitro* effect of two metalcomplexes on the growth of *T. cruzi* epimastigotes (strain Y). The parasites were treated with the compounds at concentrations ranging from 1 to 100 nM and their growth after treatment was quantified. Compound I had an IC₅₀ value of 97.71 nM and 147.53 nM, after 3 and 5 days of treatment, respectively. Compound II showed an IC₅₀ value of 122.76 nM and 104.17 nM for the same treatment times. Ultrastructural analysis of the parasites after treatment with the compounds showed that the mitochondria of the parasite present alterations in their crests, with abnormal swelling and disposition around the kinetoplast, in addition to lesions in the reservosomes and formation of crystals in their interior. In addition, treatment with both compounds caused loss of mitochondrial membrane potential of up to 66% of parasites. These compounds were active against *T. cruzi* epimastigotes presenting IC₅₀ values in the nanomolar range and affecting mitochondria and reservosomes, essential organelles for the survival of the parasite.

Keywords: Chagas disease; Metallocomplexes; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	5
Figura 2 -	Distribuição global de casos de DC	8
Figura 3 -	Estrutura química dos compostos Nifurtimox (A) e Benznidazol (B)	9
Figura 4 -	Efeitos antiproliferativos de diferentes compostos metalocomplexos em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 5 -	Efeitos antiproliferativos do composto I em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 6 -	Porcentagem de crescimento de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com o composto I	19
Figura 7 -	Efeitos antiproliferativos do composto II em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 8 -	Porcentagem de crescimento de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com o composto II	21
Figura 9 -	Análise dos efeitos citotóxicos do composto I no tratamento de células LLC-MK ₂	22
Figura 10 -	Análise dos efeitos citotóxicos do composto II no tratamento de células LLC-MK ₂	23
Figura 11 -	Microscopia eletrônica de transmissão de parasitos tratados com composto II	24
Figura 12	Microscopia eletrônica de transmissão de parasitos tratados com os compostos I e II	25

Figura 13	Imagem de microscopia confocal a laser de parasitos tratados com os compostos I e II, posteriormente incubados com o marcado de viabilidade mitocondrial JC-1	27
Figura 14	Quantificação de parasitos não tratados e tratados por 120 horas com os compostos I e II com concentração de 3 μ M e posteriormente marcados com JC-1	28
Figura 15	Imagem de microscopia de fluorescência de parasitos tratados com os compostos e posteriormente incubados com o marcado de viabilidade mitocondrial MitoTracker Red CMXRos	29
Figura 16	Quantificação de parasitos não tratados e tratados por 24 horas com os compostos I e II com concentração de 1 μ M e posteriormente marcados com DAPI e MitoTracker Red CMXRos	30
Figura 17	Imagem de microscopia de fluorescência de parasitos tratados com os compostos I e II, posteriormente incubados com o marcado de viabilidade mitocondrial MitoTracker Red CMXRos	31
Figura 18	Quantificação de parasitos não tratados e tratados por 120 horas com os compostos I e II com concentração de 1 μ M e posteriormente marcados com DAPI e MitoTracker Red CMXRos	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Doença de Chagas	2
2.2. Classificação taxonômica	3
2.3. Ciclo Biológico	3
2.4. Meios de transmissão e sintomatologia	5
2.5. Epidemiologia	7
2.6. Estratégias atuais de tratamento contra doença de Chagas	8
2.7. Metalocomplexos	10
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. METODOLOGIA	13
4.1. Manutenção dos epimastigotas <i>in vitro</i>	13
4.2. Manutenção de células LLC-MK ₂	13
4.3. Metalocomplexos	13
4.4. Ensaio de viabilidade celular	14
4.5. Ensaio antiproliferativo com epimastigotas	14
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão	15
4.7. Avaliação da interferência dos compostos na atividade mitocondrial do <i>T. cruzi</i> por microscopia de fluorescência	15
4.7.1. MitoTracker Red CMXRos	16
4.7.2. JC-1	16
5. RESULTADOS	17
5.1. Efeito no crescimento de epimastigotas	17
5.2. Análise Ultraestrutural	23
5.3. Avaliação da atividade mitocondrial	26
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Protozoários da família Trypanosomatidae são agentes causadores de doenças parasitárias que têm uma incidência elevada e representam um impacto econômico negativo nos países em desenvolvimento. A Leishmaniose, por exemplo, causada por várias espécies de *Leishmania*, afeta dezesseis milhões de pessoas na África, Ásia, partes da Europa e América Latina. A doença do sono, causada pelo *Trypanosoma brucei*, acomete cerca de três milhões de pessoas na África. Em relação à Doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, estima-se que dezesseis e dezoito milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasito e mais de sessenta milhões corram risco de infecção (WHO, 2015). No passado, a DC era restrita principalmente a países não desenvolvidos de clima tropical, como os da América do Sul. Atualmente a doença acomete também países desenvolvidos como Estados Unidos e Canadá, devido à globalização e às diversas formas de transmissão (WHO, 2010).

A principal forma de transmissão é a vetorial, através de insetos triatomíneos hematófagos como a espécie *Rhodnius prolixus*, que inclui o inseto conhecido popularmente como barbeiro, sendo este o vetor do *T. cruzi*. Outros mecanismos de transmissão possíveis são: transfusão de sangue oriunda de um doador contaminado e transmissão vertical (NUNES *et al.*, 2013).

A DC apresenta duas fases: a aguda (fase inicial) e a crônica. A maioria dos casos na fase aguda são assintomáticos, e quando os pacientes apresentam sintomas, estes são: aumento no tamanho do fígado, edema subcutâneo (como o sinal de Romaña) e, em casos de transmissão via vetor, são observados sinais da picada no local de entrada do parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Existem diferentes categorias de fase crônica desta doença, que são: indeterminada (sem manifestações clínicas), cardíaca (com manifestação de cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, parada cardíaca), digestiva (provocando aumento no tamanho do esôfago ou cólon e conseqüente problema digestivo) e a combinação de sintomas da fase crônica cardíaca e digestiva (CDC, 2015).

Atualmente, existem apenas dois fármacos para tratamento apenas na fase aguda da DC, sendo estes Nifurtimox e Benznidazol. Ambos requerem acompanhamento prolongado e extremamente cauteloso, pois conferem altos

riscos e efeitos adversos aos pacientes. Para tratar a fase crônica ainda não existem opções específicas de fármacos. Com isto, a busca por novas alternativas terapêuticas, que ofereçam tratamento para ambas as fases, com riscos baixos de efeitos colaterais, se faz necessária (CHAMOND *et al.*, 2002). Os metalocomplexos vem se apresentando como uma promissora alternativa em terapias antiparasitárias, e neste contexto, o projeto aqui descrito propõe a avaliação do efeito de compostos metalocomplexos sobre *T. cruzi*, a fim de destacá-los como opção de desenvolvimento de novos fármacos contra a DC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença de Chagas

A DC foi descrita pela primeira vez pelo brasileiro Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, há mais de 100 anos (CHAGAS, 1909) e recebeu este nome em homenagem ao médico e pesquisador que a descreveu. Durante o projeto de erradicação da malária em Minas Gerais, Chagas observara a existência de uma doença causada por um protozoário flagelado. Chagas primeiro detectou estes protozoários no intestino de insetos conhecidos como barbeiros. Pesquisando possíveis hospedeiros vertebrados para este parasito, encontrou Berenice, uma criança de dois anos que se tornou o primeiro caso registrado de infecção aguda causada por este protozoário flagelado em humanos. O parasito recebeu o nome, *Trypanosoma cruzi*, em homenagem à Oswaldo Cruz, cientista pioneiro em medicina experimental no Brasil (RASSI JÚNIOR *et al.*, 2010).

A DC é também conhecida como a tripanossomíase americana, sendo uma doença potencialmente fatal. A principal forma de transmissão da doença é através do inseto vetor hematófago, conhecido como barbeiro. Estes insetos geralmente habitam rachaduras de paredes de casas de barro ou de madeira em áreas rurais ou suburbanas. O vetor normalmente se esconde durante o dia e se tornam ativos à noite, quando vão à busca de alimentos como o sangue humano. Eles costumam picar uma área exposta da pele, como a face, e no momento do repasto sanguíneo, defecam em área próxima à da picada. Os parasitos entram no organismo quando a pessoa instintivamente coça o local da picada, ferindo a derme e assim espalhando as fezes no local da picada, podendo o parasito também alcançar os

olhos, a boca ou qualquer outra parte com rupturas ou pequenas lesões na pele (TONG *et al.*, 1998; COURA, 2007).

2.2. Classificação taxonômica

O *T. cruzi* pertence ao reino Protista, filo Euglenozoa, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastidiae, família Trypanosomatidae, gênero Trypanosoma, subgênero Schizotrypanum, espécie *Trypanosoma cruzi*. O inseto vetor da doença, pertence ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae, gêneros Triatoma, Panstrongylus e Rhodnius (NEVES, 2005).

O gênero Trypanosoma é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae, por albergar espécies de importância etiológica, uma vez que provocam diversas doenças tanto em humanos quanto em outros animais. Entre os parasitos deste gênero está o *T. cruzi*, *T. brucei rhodesiense* (causador da doença do sono da África oriental), *T. brucei gambiense* (agente etiológico da doença do sono da África ocidental), *T. equinum* (causador do mal das cadeiras em equinos), *T. equiperdum* (Durina - Equinos e asininos), entre outros (BRENNER *et al.*, 2000).

2.3. Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxeno, em que o parasito realiza multiplicação intracelular, no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos), e extracelular, no inseto vetor (triatomíneos). Entre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* apresenta um dos ciclos de vida mais complexos, que envolve vários estágios de desenvolvimento do parasito encontrados nos hospedeiros invertebrados e nos vertebrados (NEVES, 2005) (Figura 1).

O ciclo se inicia quando o inseto da família Reduviidae suga o sangue de vertebrados infectados com formas tripomastigotas que circulam na corrente sanguínea, e são por isso conhecidos como tripomastigotas sanguíneos. Uma vez ingerido o sangue, os tripomastigotas são lisados no estômago do inseto (CASTRO *et al.*, 2007). Após poucos dias, os tripomastigotas sobreviventes transformam-se em epimastigotas e migram para o intestino, onde se dividem intensamente e aderem às membranas perimicrovilares, que são secretadas por células do

intestino médio posterior do inseto (ALVES *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2007). Esta etapa é importante para desencadear o processo de transformação dos epimastigotas, não-infectivos, em tripomastigotas metacíclicos, que são altamente infectivos. O processo de adesão de epimastigotas à membrana perimicrovilar envolve a participação de glicoconjugados expostos à superfície, e proteínas encontradas na membrana perimicrovilar parecem estar envolvidas nesse processo (ALVES *et al.*, 2007). Após a metaciclogênese, os tripomastigotas metacíclicos permanecem na ampola retal até que ocorra um novo repasto sanguíneo, momento em que essas formas serão liberadas junto com as fezes do inseto (GARCIA *et al.*, 2007).

Os tripomastigotas metacíclicos infectam várias espécies de mamíferos, incluindo humanos. Normalmente, a infecção de mamíferos ocorre no momento do repasto sanguíneo do inseto, e os tripomastigotas liberados nas fezes tem acesso ao organismo do hospedeiro vertebrado ao penetrar na pele lesionada ou via mucosas e invadem as células no local da picada como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais. Dentro da célula hospedeira, os tripomastigotas metacíclicos são inicialmente envolvidos por um vacúolo endocítico conhecido como o vacúolo parasitóforo, mas logo conseguem escapar para o citosol, onde se diferenciam em formas amastigotas, de modo que as formas amastigotas no citosol entram em contato direto com as organelas das células hospedeiras. Após várias divisões celulares, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, que rompem a célula hospedeira e são liberados para o meio extracelular, alcançando novos tecidos através da corrente sanguínea e livres podem ser ingeridos por um triatomíneo novamente durante um novo repasto sanguíneo completando assim o ciclo do *T. cruzi* (CARVALHO & DE SOUZA, 1989).

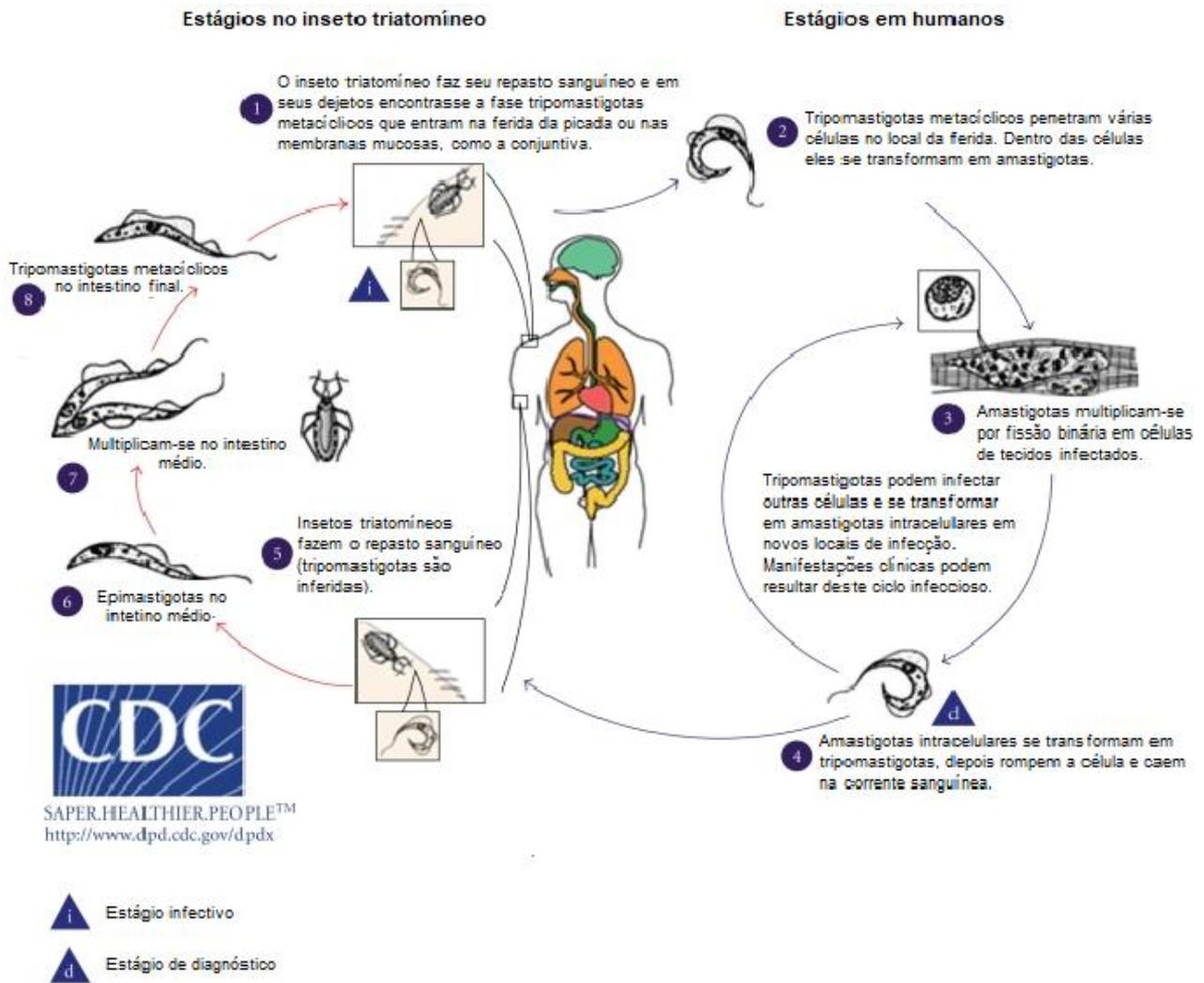


Figura 1 - Ciclo de vida de *T. cruzi*. Demonstra-se as diferentes formas de protozoário nos invertebrados (triatomíneos) e nos vertebrados (mamíferos) hospedeiros. A figura mostra tripomastigotas metacíclicos ganhando o organismo do hospedeiro através do repasto sanguíneo do inseto vetor (1), e posteriormente tripomastigotas metacíclicos penetrando diferentes células e se diferenciando em amastigotas (2). As amastigotas se multiplicam (3) e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos rompendo as células (4). Um novo inseto vetor faz o repasto sanguíneo e com isso ingerem formas tripomastigotas sanguíneas (5), e posteriormente se diferenciam em epimastigotas (6). Epimastigotas se multiplicam (7) e se diferenciam novamente em tripomastigotas metacíclicos (8), completando o ciclo. (Reproduzida a partir da homepage do Center for Diseases Control)

2.4. Meios de transmissão e sintomatologia

Além da transmissão pelo inseto vetor, outros importantes mecanismos de transmissão devem ser considerados, como a transfusão de sangue, transmissão vertical e através de transplante de órgãos. Atualmente estes mecanismos são

muito menos frequentes devido a programas de controle de vetores e maior segurança biológica em processos de doação de sangue. O *T. cruzi* pode também ser transmitido, em menores ocorrências, através do consumo de alimentos contaminados pelas fezes do barbeiro e acidentes laboratoriais (DIAS *et al.*, 2008). No entanto, mostrou-se que o parasito pode ser transmitido por via oral (YOSHIDA, 2009), ocasionada principalmente pela ingestão de caldo de cana, açaí e palmito de açazeiro contaminados e não pasteurizados (NÓBREGA *et al.*, 2009).

O *T. cruzi* induz uma infecção aguda que dura menos de 90 dias, com elevada parasitemia no sangue e sintomas geralmente brandos ou não específicos, o que faz com que o diagnóstico muitas vezes seja falho. No entanto, em alguns casos, a fase aguda pode ser fatal, ou ainda levar a quadros de miocardite e meningoencefalite (BERN *et al.*, 2008). No local da entrada do parasito pode haver formação de uma lesão inflamatória, conhecida como Chagoma de inoculação. Se o local da infecção for a mucosa ocular, o chagoma é chamado de Sinal de Romaña, um edema unilateral e bipalpebral. Dentro das células do organismo hospedeiro, o parasito começa a se multiplicar em ciclos assíncronos, promovendo destruição tecidual. Em muitos indivíduos a fase aguda apresenta sintomas bem discretos. No entanto, quando há manifestações, estas ocorrem em um período de 7 a 14 dias e incluem febre, hepatoesplengomegalia, náuseas, vômito, diarreia, anorexia, irritação da meninge e conjuntivite. Um pequeno número de pacientes desenvolve miocardite, podendo apresentar taquicardia, cardiomegalia e falência cardíaca. A fase aguda é seguida por uma fase crônica na qual a parasitemia diminui, atingindo níveis baixos que impedem a detecção do parasito por exames de sangue direto (TANOWITZ *et al.*, 1992).

Na fase crônica da doença, os parasitos estão alojados principalmente no coração e músculo liso do sistema digestivo. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de problemas no sistema digestivo (tipicamente alargamento do esôfago ou do cólon), ou alterações neurológicas mistas. Nos anos posteriores à infecção, pode ocorrer morte súbita ou insuficiência cardíaca causada por destruição progressiva do músculo cardíaco e do seu sistema nervoso periférico (COURA, 2007).

2.5. Epidemiologia

A DC ocorre principalmente nos países da América Latina, América Central e em partes da América do Norte, sendo causa de muitos casos de morbidade e mortalidade nestes países. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente oito milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com *T. cruzi* e cerca de 10000 – 14000 mortes por ano são causadas por DC (Revisto por RASSI JÚNIOR *et al.*, 2012). Nas áreas endêmicas, a doença acomete mais frequentemente indivíduos residentes em áreas rurais devido à coabitação entre insetos vetores infectados, animais domésticos e o próprio homem (DIAS, 2007).

A doença é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina, incluindo o Brasil. No entanto, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais detectados casos da doença nos Estados Unidos da América, Canadá, em muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Isto pode ser facilitado principalmente devido à mobilidade da população entre a América Latina e os outros países (WHO, 2015).

Em países anteriormente considerados livres da doença, tais como o Japão e a Austrália, são cada vez mais encontrados novos casos (Figura 2). Em 2006, o Brasil foi certificado pela OMS como uma área livre de DC em relação à transmissão vetorial por *Triatoma infestans* (RASSI JÚNIOR, 2010; SILVEIRA & DIAS, 2011), e embora a prevalência da DC tenha diminuído nas últimas décadas, dados recentes mostram que no Brasil, cerca de 2,4% ou 4,6 milhões de brasileiros estejam infectados pelo *T. cruzi* (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

Distribuição global de casos de DC, com base em estimativas oficiais, 2006-2010

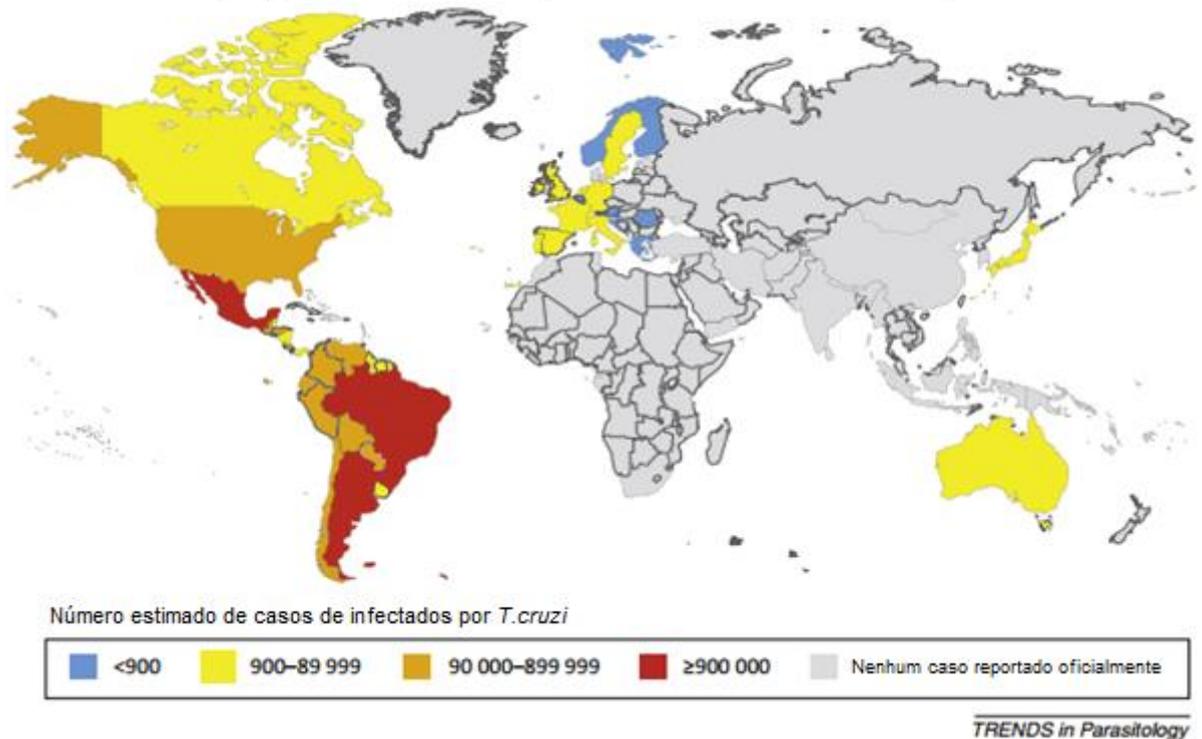


Figura 2 - Distribuição global de casos de DC. A propagação da DC ao longo de diferentes países anteriormente considerados livres da doença é problemática devido à presença de vetores nativos que podem propiciar a transmissão de infecção. (Adaptado de WHO – 2013).

2.6. Estratégias atuais de tratamento contra doença de Chagas

Atualmente, o tratamento utilizado é mais sintomático do que voltado para a eliminação total dos parasitos no organismo do hospedeiro. Assim, do ponto de vista sintomático, procura-se amenizar as diversas manifestações da doença, através da administração de diuréticos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Do ponto de vista etiológico, o Nifurtimox (Lampit®, Bayer) e Benznidazol (Rochagan®, Roche) são os fármacos indicados há mais de três décadas (DIAS & SCHOFIELD, 1999) (Figura 3). Entretanto, esses fármacos são ativos somente na fase aguda da doença, e o Nifurtimox não é mais comercializado no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. No Brasil, o benznidazol é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) (FAIRLAMB, 1999; SCHOFIELD *et al.*, 2006).

O Nifurtimox (Nif, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamina) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) é um nitrofurano que foi desenvolvido pela Bayer em 1967 e comercializado como Lampit®. Age reduzindo o grupamento nitro para gerar nitro-

ânions que posteriormente reagem com oxigênio molecular para produzir superóxido e peróxido de hidrogênio, responsáveis por provocar efeitos citotóxicos às células (DOCAMPO & STOPPANI, 1979). Hoje, Nifurtimox é produzido pela Bayer HealthCare na Corporación Bonima em El Salvador.

O Benznidazol (Bz, N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) é um nitroimidazol que foi desenvolvido pela Roche em 1972 e foi anteriormente comercializado como Rochagan® ou Radanil® (COURA & BORGES-PEREIRA, 2011). Assim como o Nifurtimox, o principal efeito citotóxico do Benznidazol está relacionado à atividade enzimática da redução do grupamento nitro que resulta em radicais livres (VIOTTI *et al.*, 2009).

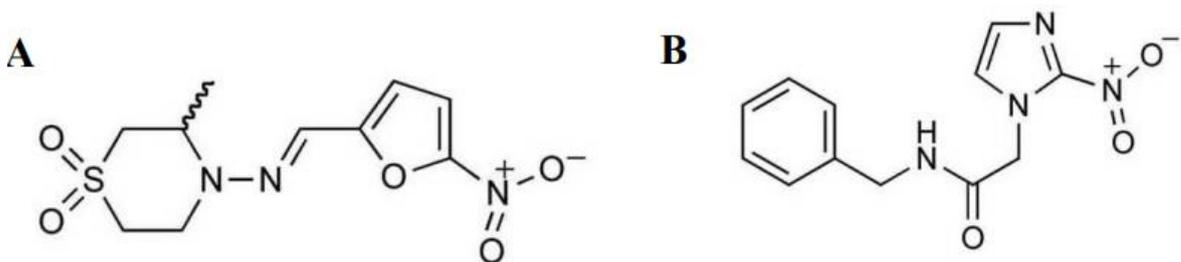


Figura 3 – Estrutura química dos compostos Nifurtimox (A) e Benznidazol (B). (Retirado de BOSCARDIN *et al.*, 2009).

O tratamento também é indicado para aqueles em que a infecção foi reativada devido à imunossupressão. Para adultos infectados, especialmente em casos assintomáticos, também deve ser oferecido o tratamento antiparasitário, pois pode prevenir a progressão da doença. Apesar dos benefícios potenciais da medicação para prevenir ou retardar o desenvolvimento da DC deve se considerar a longa duração do tratamento, de até 2 meses, e as possíveis reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados (MOREL, 1999).

Tanto o Benznidazol como o Nifurtimox provocam sérios efeitos colaterais como hiporexia, perda de peso, náuseas, vômitos, alergia cutânea e neuropatia periférica. Além disso, esses medicamentos apresentam baixa eficácia, uma vez que algumas cepas estudadas apresentam diferentes níveis de resistência para esses fármacos (VERONESI, 1991; CINQUE *et al.*, 1998; BUCKNER *et al.*, 2001).

O Benznidazol e o Nifurtimox não devem ser utilizados para tratamento de mulheres grávidas ou de pessoas com insuficiência renal ou hepática. O Nifurtimox também é contraindicado para pessoas com histórico de distúrbios neurológicos ou psiquiátricos (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006).

Com base no conhecimento atual das características biológicas do parasito e do hospedeiro, um fármaco ideal para tratar a DC deveria apresentar os seguintes atributos: atividade contra as diferentes formas evolutivas do parasito presentes nos hospedeiros mamíferos e nos diferentes reservatórios do parasito, necessidade de administração oral de poucas doses, baixa toxicidade e um perfil de segurança melhorado (incluindo possibilidade de tratamento para crianças e mulheres em idade reprodutiva), baixo custo e estabilidade adequada para manutenção em temperaturas tropicais e que apresente níveis elevados de acúmulo nos tecidos e com meia-vida longa (NWAKA & HUDSON, 2006).

2.7. Metalocomplexos

Os metais de transição oferecem mais vantagens quando comparados a outros fármacos comuns baseados em compostos orgânicos. Estas vantagens se devem ao fato de os metais possuírem diferentes possibilidades de coordenação e geometria com o ligante de interesse, o fármaco, além de grande diversidade estrutural (VAN RIJT & SADLER, 2009). Podem também apresentar diferentes estados de oxidação, além de interagirem e se coordenarem comumente com moléculas ricas em elétrons, como proteínas e DNA (ORVIG & ABRAMS, 1999).

A coordenação dos metais com os ligantes resulta em uma configuração tridimensional, onde a molécula pode reconhecer alvo molecular e realizar a interação de forma mais estável e específica (FRICKER, 2007). Esta coordenação pode alterar as características dos compostos utilizados, revertendo perfis de resistência da célula-alvo ao composto utilizado. Esta reversão do perfil de resistência pode ocorrer pelo fato de que os mecanismos normalmente utilizados pelas células podem não ser ativados quando o composto está ligado a um metal. Com isso, alguns efeitos colaterais gerados pelos compostos não coordenados podem ser reduzidos após a adição de um metal. Em alguns casos há sinergismo entre o metal e o ligante, levando à diminuição das concentrações necessárias para obter a ação biológica desejada (MENDES *et al.*, 2005; PÉREZ-REBOLLEDO *et*

al., 2005). Os metais podem possibilitar o aumento da lipofilicidade do fármaco após sua coordenação ao mesmo, facilitando a difusão através das membranas biológicas (BRUIJNINCX & SADLER, 2010).

Atualmente, estes complexos metálicos têm sido estudados em diferentes aplicações biológicas para combater os mecanismos de resistência desenvolvidos por alguns agentes causadores de doenças (WRIGHT & SUTHERLAND, 2007). Dentre estes estudos, encontra-se a conjugação destes complexos a antibióticos, os quais demonstram propriedades terapêuticas mais eficazes quando comparado ao fármaco não coordenado. Complexos formados com o metal de transição paládio e o antibiótico tetraciclina apresentaram atividade antibacteriana contra linhagem resistente de *Escherichia coli*. O composto coordenado à tetraciclina mostrou atividade 16 vezes maior do que a droga não coordenada (GUERRA *et al.*, 2005).

Estudos prévios relatam metalocomplexos como alternativa à terapia anti-câncer (BRUIJNINCX & SADLER, 2010), como o que mostra o efeito de um composto de coordenação de cobre (II) com diferentes ligantes que provocaram uma inibição de 92,4% do crescimento do tumor em testes *in vivo* (BORGES *et al.*, 2016). Compostos de coordenação também de cobre (II), com diferentes ligantes, mostraram efeitos antiproliferativos contra linhagens celulares de leucemia, sendo quase quatro vezes menos tóxicas as células não cancerígenas que a cisplatina (FERNANDES *et al.*, 2015).

Os metalocomplexos também se apresentam como alternativa na busca por compostos que ofereçam atividade antiparasitária. Estudos *in vitro* testaram as atividades de diferentes metalocomplexos contra *Plasmodium falciparum* e os compostos de manganês (II), cobre (II) e ferro (II), mostram ser os mais adequados para o desenvolvimento de possíveis medicamentos antimaláricos (HUBIN *et al.*, 2014). Compostos de ferro (III) mostram aumento na produção de ROS em células hospedeiras infectadas, reduzindo em 60% a população de *Toxoplasma gondii* através de morte celular envolvendo elementos de apoptose e autofagia (PORTES *et al.*, 2015). Estudos com células hospedeiras infectadas com *T. gondii*, submetidas a tratamento com compostos de cobre (II), apresentam alterações no parasito em sua divisão celular e induziram alterações semelhantes a apoptose (PORTES *et al.*, 2017). Resultados mais recentes no mesmo modelo de infecção *in*

vitro mostram que a coordenação da sulfadiazina com o complexo de ferro (III) é uma boa estratégia para aumentar a atividade antitoxoplasma destes compostos (PORTES *et al.*, 2018).

Baseado nos dados expostos mostrando vantagens quando comparados a outros fármacos comuns, destacando suas propriedades químicas e atividades biológicas os compostos metalocomplexos são possíveis alternativas para o desenvolvimento de uma nova estratégia de tratamento para a doença de Chagas.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

- Analisar os efeitos *in vitro* de novos compostos metalocomplexos no tratamento contra epimastigotas de *T. cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento da população de formas epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com metalocomplexos em diferentes tempos de desenvolvimento dos parasitos.
- Avaliar as alterações na morfologia e ultraestrutura de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com metalocomplexos através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar o efeito dos compostos metalocomplexos mais ativos sobre o metabolismo mitocondrial do parasito, utilizando os marcadores de atividade mitocondrial MitoTracker Red CMXRos e JC-1 através de microscopia de fluorescência.

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção dos epimastigotas *in vitro*

Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidos *in vitro* em frascos de cultura de células de 25 cm² (SPL Life Sciences) em meio de cultura *Liver Infusion Tryptose* (LIT-DIFCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB-DIFCO) (Sigma Aldrich, EUA) e hemina (20 µg/mL). As culturas foram mantidas a 28° C e a cada 72 ou 96 horas, quando os parasitos estavam em fase exponencial de crescimento, foram realizadas subculturas dessas células.

4.2. Manutenção de células LLC-MK₂

Células epiteliais LLC-MK₂ (ATCC® CCL-7™, Rockville, MD, EUA) de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) foram cultivadas em frascos de cultura de células de 25 cm² em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). A cada 48 horas ou após a formação de monocamadas confluentes, as culturas foram tratadas com solução de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, EUA) para obtenção de subculturas.

4.3. Metalocomplexos

Os compostos utilizados foram sintetizados no Laboratório de Ciências Químicas (LCQ) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pelo grupo dos professores Adolfo Horn Júnior e Christiane Fernandes. Os compostos foram denominados: composto I, composto II e composto III. Os compostos selecionados, composto I e composto II, possuem núcleo de ferro e o ligante orgânico BMPA. Os mesmos foram diluídos no solvente dimetilsufóxido (DMSO) e adicionados diretamente ao meio de cultura. Os estoques foram mantidos em concentração de 5 mM e serão armazenados a -22 °C. A concentração de DMSO nos ensaios não excedeu a de 0,01%, evitando assim interferência da viabilidade dos parasitos e células hospedeiras.

4.4. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células LLC-MK₂ após o tratamento com os compostos foi avaliada com base na redução de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (CORY *et al.*, 1991). Em placas de 96 poços foram cultivadas 1×10^5 células por poço em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas as células foram lavadas novamente com meio RPMI 1640 e submetidas a tratamento com os compostos em diferentes concentrações variando de 200 nM à 1 μ M. Como controle negativo, as células foram cultivadas nas mesmas condições sem a adição dos compostos. Como controle positivo, as células foram tratadas com Triton X-100 a 10%.

Após 24 horas de tratamento, 20 μ l de MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution) foram adicionados em cada poço da placa contendo as amostras tratadas ou não em 100 μ l de volume final, incubada por 4 horas a 37° C e 5% CO₂. Para medir a quantidade de formazan solúvel produzido pela redução celular de MTS, foi registrada a absorbância a 490 nm da placa de 96 poços em um leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices) usando o software 6.0 SoftMax Pro. Os dados foram plotados usando o software GraphPad Prism 5.0. Os dados apresentados foram representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.5. Ensaio antiproliferativo com epimastigotas

Em frascos para cultivo de células foram adicionados 1×10^5 parasitos em 10 mL de solução contendo meio LIT suplementado com SFB a 10%, e após 24 horas foram adicionados os compostos metalocomplexos em diferentes concentrações para os ensaios de curvas de crescimento e obtenção do IC₅₀ (concentração inibitória do crescimento em 50%) dos compostos. Cada composto foi testado em triplicata. Em todos os experimentos, foram preparados ensaios na ausência de quaisquer compostos, para controle negativo.

Os parasitos foram quantificados a cada 24 horas, em até 120 horas de tratamento. A quantificação foi feita em Câmara de Neubauer observada em microscópio óptico convencional.

Para o cálculo de IC₅₀, a porcentagem de inibição do crescimento foi plotada

como função da concentração do composto ajustando os valores de análise da curva não linear. A análise de regressão foi feita usando o programa Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

Para os testes de significância foi usado o software Graph Pad Prism 5.0. Foi feito a análise de variância quantitativa Two-way ANOVA.

4.6. Microscopia eletrônica de transmissão

Com o objetivo de avaliar a ultraestrutura dos parasitos, na ausência e presença dos compostos em diferentes concentrações, experimentos para microscopia eletrônica de transmissão com diferentes tempos de interação foram realizados. As amostras foram fixadas durante 1 hora em solução contendo glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Após fixação, os parasitos foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 10 minutos. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% e ferrocianeto (FeCNK) a 1,6% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora, em ambiente protegido de luz. Posteriormente, os parasitos foram lavados duas vezes com cacodilato de sódio 0,1 M por 10 minutos. As amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de acetona (30% a 100%) seguida de infiltração em resina epóxi. Após este processo, o material permaneceu por 48 horas à temperatura de 60° C para polimerização. Secções ultrafinas das amostras foram obtidas e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. Posteriormente as amostras foram observadas e imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão FEI SPIRIT 120 Kvolts.

4.7. Avaliação da interferência dos compostos na atividade mitocondrial do *T. cruzi* por microscopia de fluorescência

Com o objetivo de avaliar o potencial de membrana mitocondrial de parasitos, os mesmos foram tratados ou não com os diferentes compostos, por diferentes tempos, e posteriormente incubados com os marcadores fluorescentes MitoTracker Red CMXRos e JC-1.

4.7.1. MitoTracker Red CMXRos

O marcador MitoTracker Red CMXRos é um corante vermelho-fluorescente que evidencia mitocôndrias em células vivas e seu acúmulo é dependente do potencial de membrana mitocondrial (POOT *et al.*, 1996). Para marcação com esse marcador, foram incubados parasitos em condições de ensaio antiproliferativo descrito anteriormente no item 4.5, com o marcador na concentração de 100 nM, por 40 minutos a temperatura de 37° C (REA *et al.*, 2013). Posteriormente os parasitos e células hospedeiras foram fixados com formaldeído a 2% em PBS por 15 minutos. Os parasitos já fixados foram depositados sobre lamínulas de vidro que foram tratadas previamente com Poli-L-lisina por 30 minutos. Com os parasitos já aderidos às lamínulas, foi feita a marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) na concentração de 30 nM, por 30 minutos. Para montagem das lâminas, as lamínulas foram depositadas sobre ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, EUA) e mantidas protegidas da luz. As amostras foram observadas e imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan. A solução estoque de MitoTracker Red CMXRos foi recém-preparada a 1 mM em DMSO e armazenada a -20° C, sendo mantido protegida da luz. A quantificação foi feita através da contagem direta de 100 parasitos e a diferenciação entre parasitos com mitocôndrias ativas ou não foi feita de acordo com a intensidade da marcação.

4.7.2. JC-1

O JC-1 é um marcador catiônico lipofílico de viabilidade mitocondrial que também se concentra na mitocôndria em resposta a sua atividade. O marcador existe como um monômero em baixas concentrações, onde a emissão é 530 nm (fluorescência verde), mas em altas concentrações forma J-agregados após acúmulo na mitocôndria, onde a emissão é 590 nm (fluorescência vermelha). Assim, a fluorescência de JC-1 é considerada um indicador de um estado mitocondrial energizado (REERS *et al.*, 1995). Para marcação com JC-1, foram incubados parasitos em condições de ensaio antiproliferativo descrito anteriormente no item 4.5, com o marcador na concentração de 10 µg/ml, por 30 minutos à temperatura de 37° C (Macedo-Silva *et al.*, 2011). Após esse período, as amostras foram avaliadas e imagens obtidas por microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM-710. Para a solução estoque, o JC-1 foi diluído em meio LIT e

armazenado a -20°C protegido da luz. A quantificação foi feita através da contagem direta de 100 parasitos e a diferenciação foi feita de acordo com a intensidade e presença de marcação das mitocôndrias em vermelho, para células com mitocôndrias ativas e somente verde, para inativas (coloração vermelha).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito no crescimento de epimastigotas

Testes preliminares em formas epimastigotas de *T. cruzi* após o tratamento com compostos metálicos (Figura 4), mostraram que os compostos capazes de inibir o crescimento do parasito e que apresentaram melhor desempenho foram os compostos I e II e com isto, estes compostos foram selecionados para testes mais detalhados. Estes compostos possuem uma estrutura orgânica similar por terem o mesmo ligante orgânico e por ambos possuírem núcleo de ferro, o que indica maior sensibilidade dos epimastigotas a essa construção molecular.

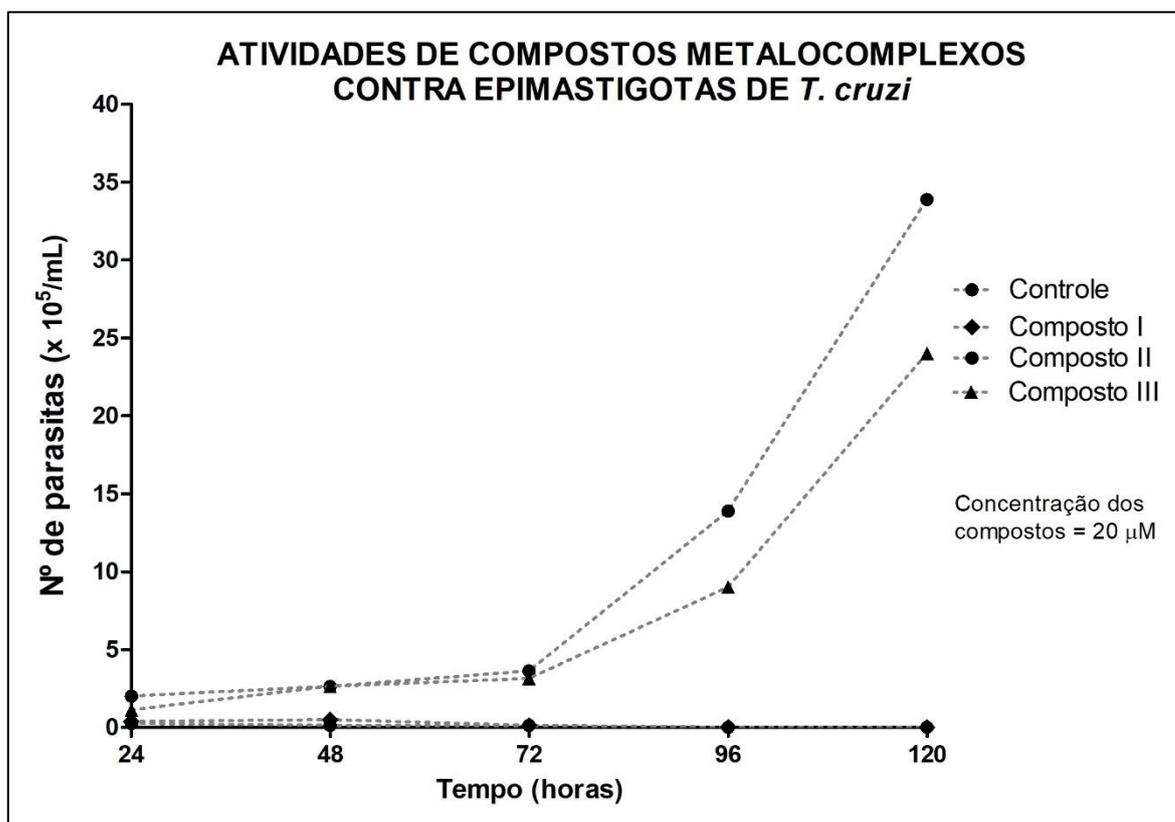


Figura 4 – Efeitos antiproliferativos de diferentes compostos metalocplxos em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Crescimento dos parasitos após tratamento com diferentes compostos na concentração de 20 µM, por até 120 horas.

Em curvas de crescimento do parasito após tratamento com o composto I (Figura 5) nas concentrações de 10, 50, 90, 130 e 190 nM, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, observamos um controle significativo de seu crescimento, a partir de 48 horas de tratamento. O composto I foi o que apresentou os menores valores de IC₅₀, iguais a 97.71, 66.29 e 147.53 nM, para os tempos de 72, 96 e 120 horas de tratamento, respectivamente.

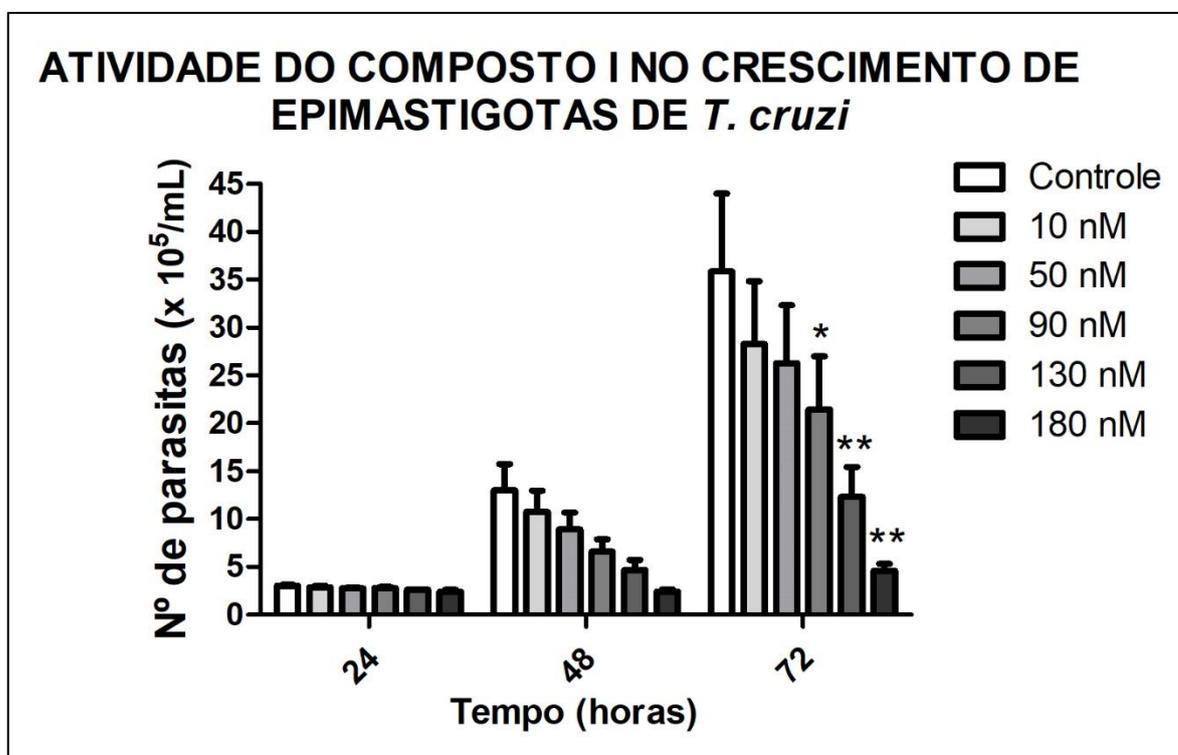


Figura 5 - Efeitos antiproliferativos do composto I em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Crescimento dos parasitos após tratamento com o composto I em diferentes concentrações por até 72 horas. *P ≤ 0.05 e **P ≤ 0.001 em relação ao controle.

Podemos notar melhor este resultado com o composto I observando a porcentagem de crescimento dos parasitos (Figura 6), onde houve ao fim de 72 horas de tratamento uma redução no crescimento dos parasitos de 20 a 80%, de acordo com o aumento das concentrações utilizadas, quando comparados ao controle sem tratamento.

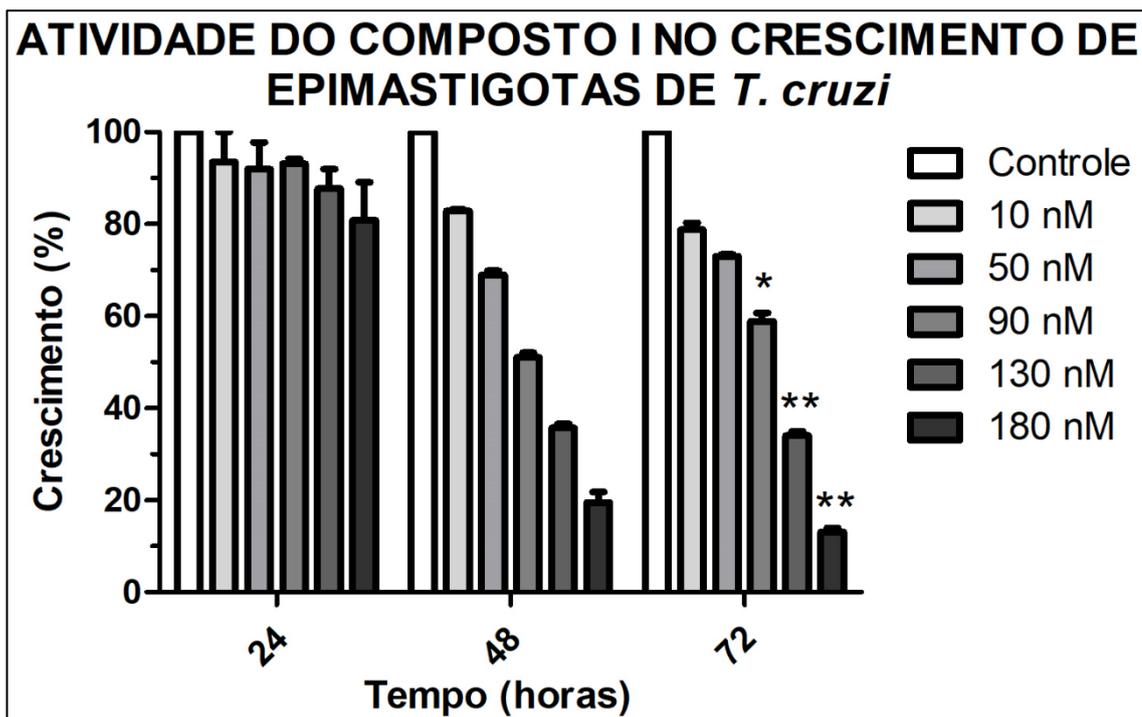


Figura 6 - Porcentagem de crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com o composto I. Crescimento dos parasitos após tratamento com o composto I em diferentes concentrações por até 72 horas. *P ≤ 0.05 e **P ≤ 0.001 em relação ao controle.

Em curvas de crescimento do parasito após tratamento com o composto II (Figura 7) nas concentrações de 20, 60, 110, 150 e 200 nM, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, observamos também um controle significativo a partir de 48 horas de tratamento, reduzindo o número de parasitos drasticamente nas horas seguintes em comparação ao número de parasitos encontrado no controle sem o tratamento. Com concentrações um pouco maiores, o composto II apresentou resultados semelhantes ao composto I na redução dos efeitos antiproliferativos em epimastigotas. O composto II apresentou valores de IC₅₀ também muito baixos, sendo estes: 122.76, 69.27 e 104.17 nM para os mesmos tempos de tratamento, 72, 96 e 120 horas.

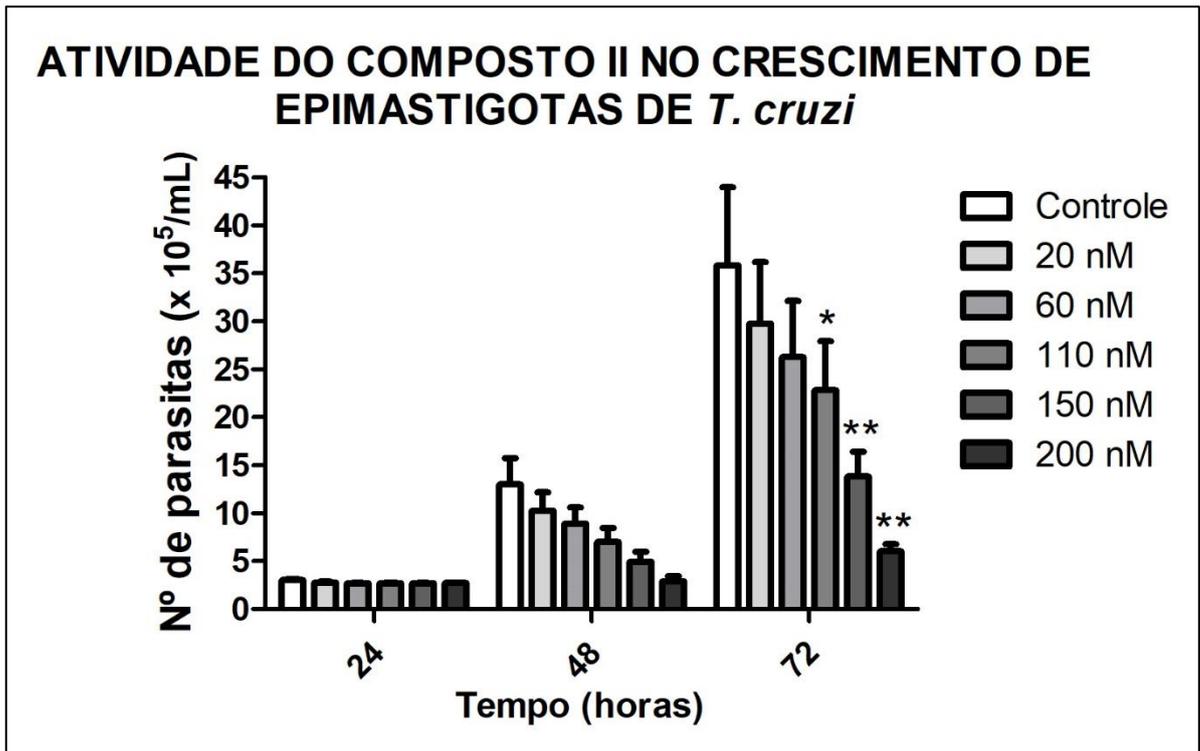


Figura 7 - Efeitos antiproliferativos do composto II em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Crescimento dos parasitos após tratamento com o composto I em diferentes concentrações por até 72 horas. *P ≤ 0.05 e **P ≤ 0.001 em relação ao controle.

Assim como o tratamento com o composto I, o tratamento com o composto II provocou redução significativa no crescimento do parasito após 48 horas (Figura 8), onde o gráfico mostra também que houve, ao fim de 72 horas de tratamento, uma redução no crescimento dos parasitos de 20 a 80%, conforme eram aumentadas as concentrações.

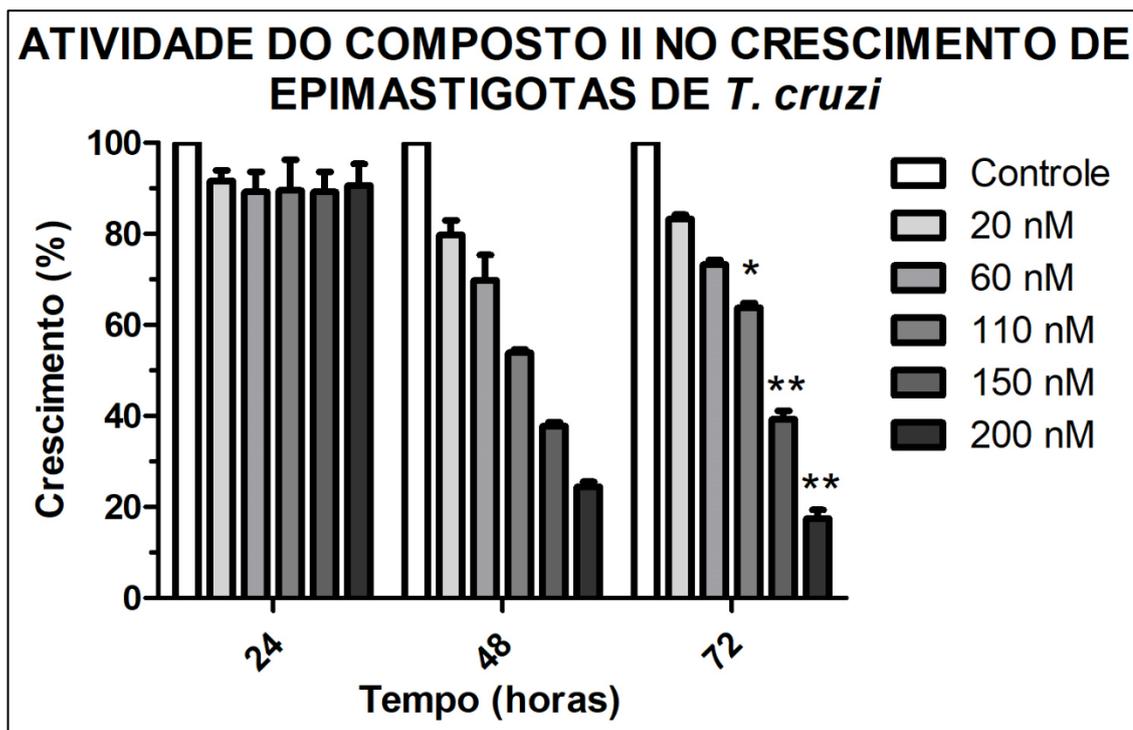


Figura 8 - Porcentagem de crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com o composto II. Crescimento dos parasitos após tratamento com o composto II em diferentes concentrações por até 72 horas. *P ≤ 0.05 e **P ≤ 0.001 em relação ao controle.

A viabilidade das células LLC-MK₂ após o tratamento com os compostos foi avaliada com base na quantidade de formazan solúvel, que é o produto da redução celular do MTS, registrando absorvância a 490 nm, a fim de averiguar a toxicidade dos compostos às células hospedeiras de mamíferos.

A viabilidade das células LLC-MK₂ foi avaliada após tratamento com o composto I (Figura 9), em concentrações que variaram de 100 nM a 10 μM, nos períodos de 24, 72 e 120 horas de tratamento. O composto I não apresentou toxicidade significativa às células nos tempos de 24 e 72 horas, porém após 120 horas de tratamento com a concentração de 10 μM, houve redução de aproximadamente 28% na viabilidade das células.

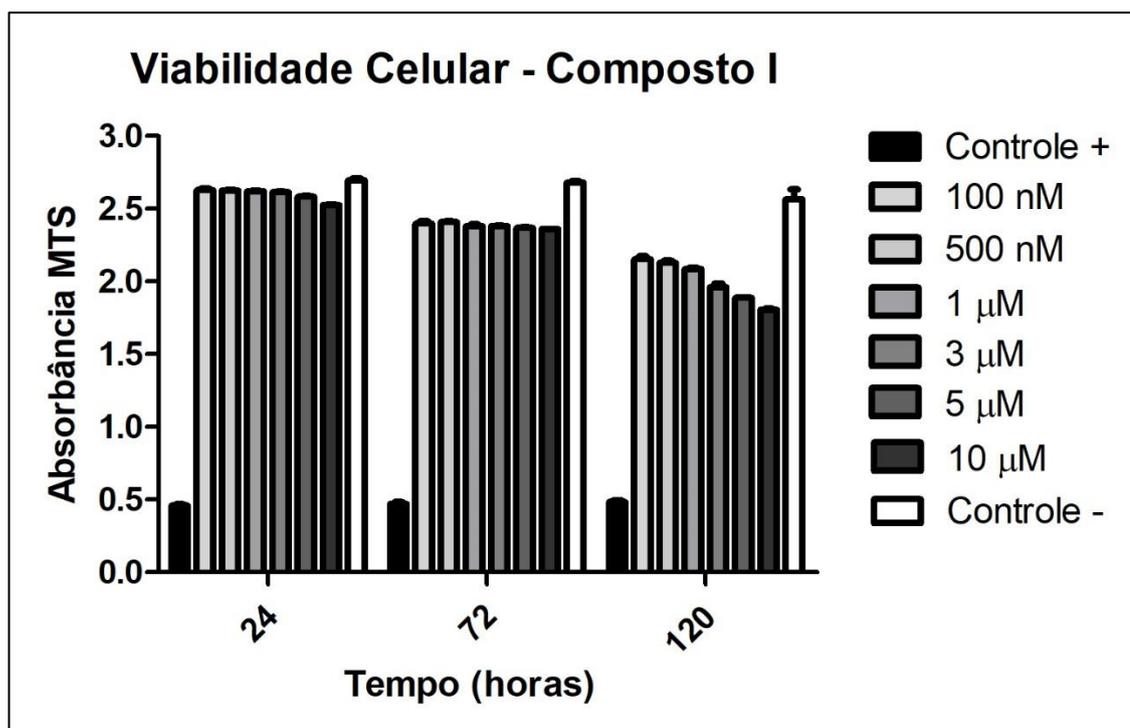


Figura 9 – Análise dos efeitos citotóxicos do composto I no tratamento de células LLC-MK₂. Quantificação da absorbância gerada pela quantidade de formazan solúvel produzido pela redução celular de MTS de células tratadas com diferentes concentrações do composto I. Absorbância registrada em 490 nm.

A viabilidade das células LLC-MK₂ foi avaliada após tratamento com o composto II (Figura 10), também nas concentrações que variam de 100 nM, a 10 μM, nos períodos de 24, 72 e 120 horas de tratamento. O composto II não apresentou toxicidade significativa às células nos tempos de 24 e 72 horas, para todas as concentrações, no entanto, afetou a viabilidade das células em torno de 26%, após 120 horas de tratamento com a concentração de 10 μM.

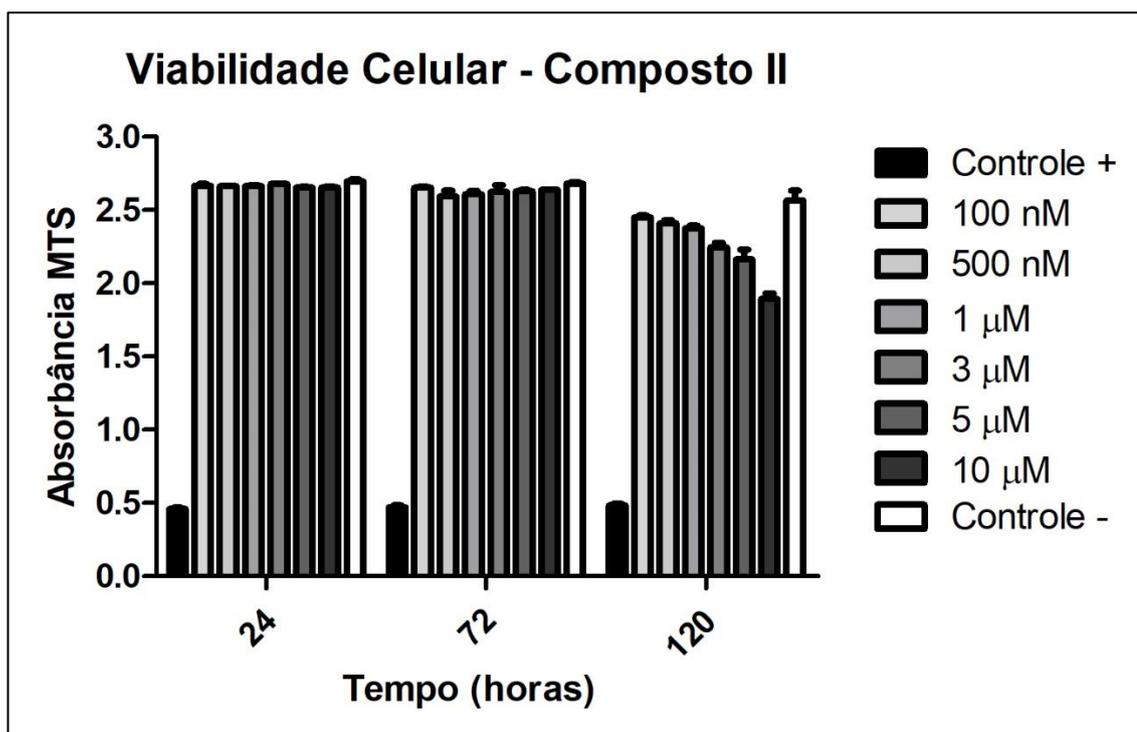


Figura 10 – Análise dos efeitos citotóxicos do composto II no tratamento de células LLC-MK₂. Quantificação da absorbância gerada pela quantidade de formazan solúvel produzido pela redução celular de MTS de células tratadas com diferentes concentrações do composto II. Absorbância registrada em 490 nm.

5.2. Análise Ultraestrutural

A fim de sugerir possíveis mecanismos de ação dos metalocomplexos sobre o *T. cruzi*, utilizou-se como ferramenta a análise da ultraestrutura dos parasitos após o tratamento com os compostos I e II.

Observou-se que os parasitos que não foram tratados com os compostos, e foram cultivados nas mesmas condições de tempo e meio de cultivo, apresentaram morfologia característica, com organelas bem dispostas e preservadas, como núcleo, cinetoplasto e membrana plasmática preservada (Figura 11A e 11B).

Quando se analisou os epimastigotas tratados com o composto II por 120 horas, na concentração de 1 μM, pôde-se perceber alterações em organelas importantes para a viabilidade do parasito como o cinetoplasto, considerado DNA mitocondrial do parasito, e mitocôndria, organelas essenciais para a sobrevivência do parasito. A mitocôndria apresentou inchaço e disposição anormal (Figura 11C e 11D). Observou-se também o aparecimento de vesículas de natureza desconhecida (Figura 11C e 11D).

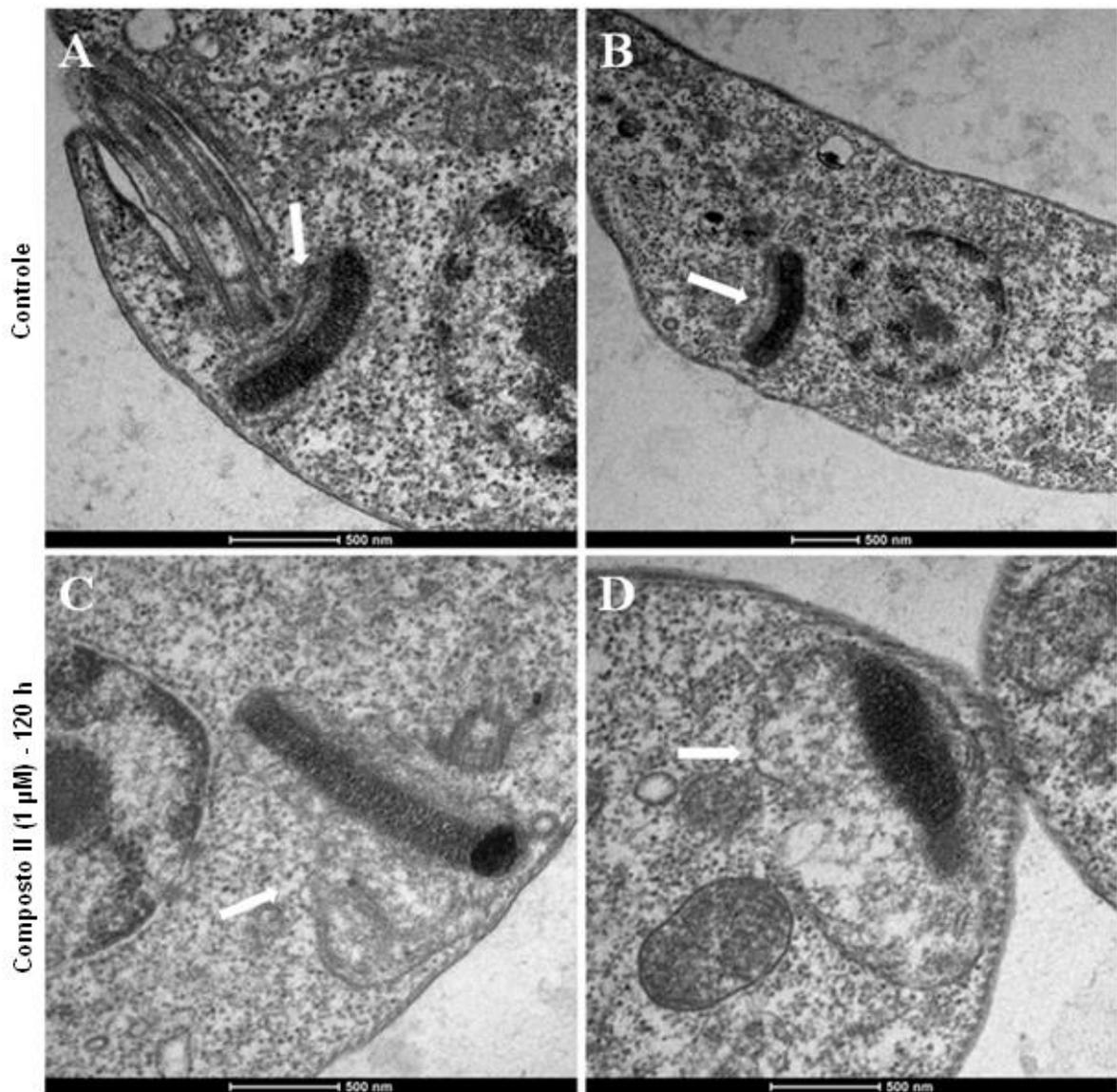


Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de parasitos tratados com o composto II. Parasitos após 120 horas de tratamento com $1\mu\text{M}$ (C e D) e não tratados e mantidos em cultura pelo mesmo tempo (A e B). Nota-se que as mitocôndrias dos parasitos tratados apresentam alterações nas cristas, com inchaço e disposição anormal em torno dos cinetoplastos (setas em C e D). Barras: 500 nm.

Ao analisarmos epimastigotas tratados com ambos os compostos por 72 horas, na concentração de 100 nM, as alterações presentes foram diferentes, enquanto os parasitos que não foram tratados com os compostos apresentaram morfologia característica (Figura 12A e 12B), o tratamento com os compostos em concentrações mais baixas que $1\mu\text{M}$, concentração do tratamento anterior, provocou alterações nos reservossomos, que apresentaram espículas em seu interior, tanto em parasitos tratados com o composto I (Figura 12E e 12F), como

também em tratados com o composto II (Figura 12C e 12D). Acreditasse que não foi possível observar anteriormente os reservossomos nos parasitos tratados com concentrações maiores, por já estarem degradadas.

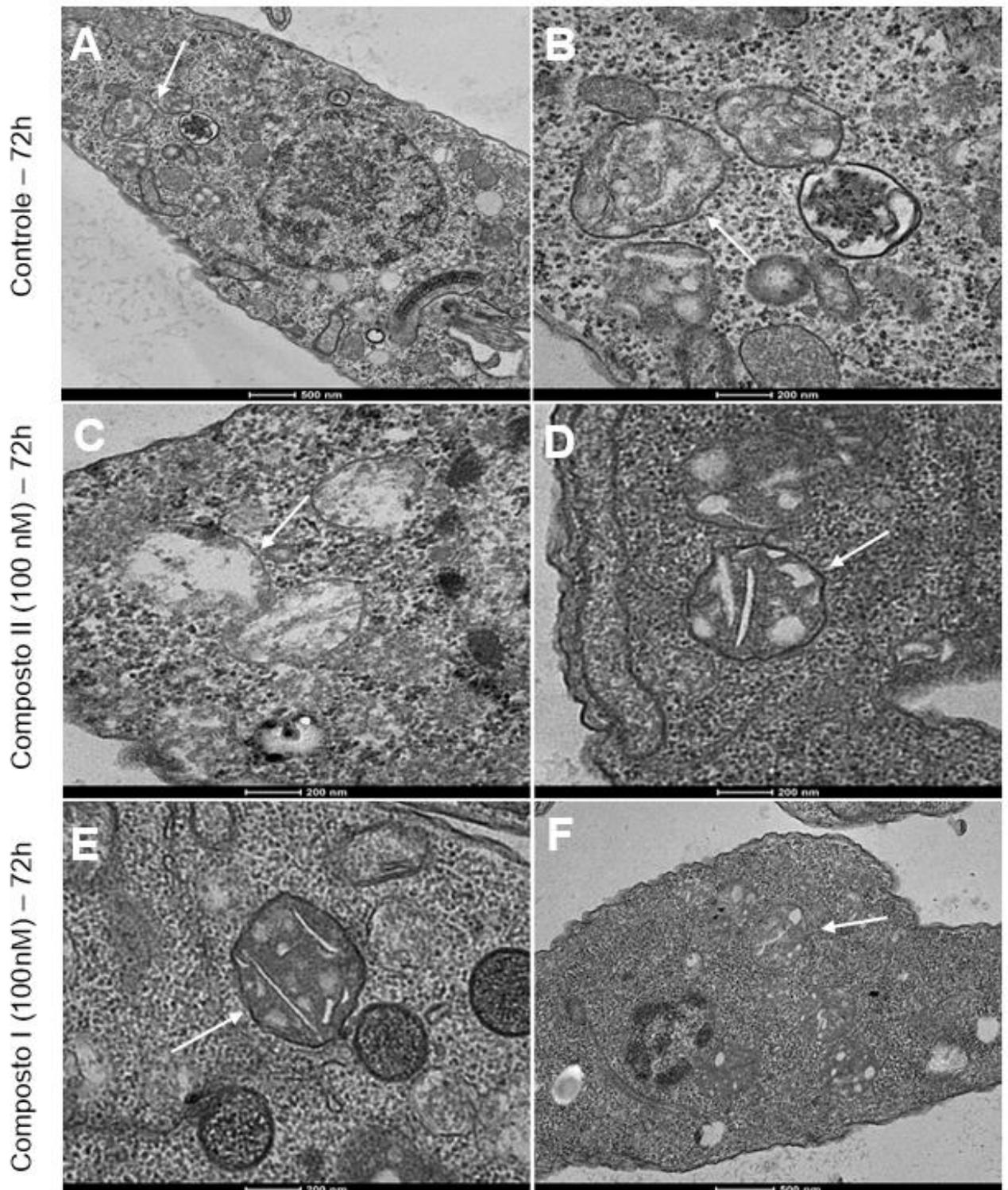


Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão de parasitos tratados com os compostos I e II. Parasitos não tratados (A e B) e mantidos em cultura pelo mesmo tempo do que

parasitos tratados após 72 horas de tratamento com o composto II (C e D) e composto I (E e F), ambos na concentração de 100 nM. Nota-se que os reservossomos dos parasitos tratados apresentam espículas e degradações em sua estrutura (setas em C, D, E e F). Barras: 500 e 200 nm.

5.3. Avaliação da atividade mitocondrial

A análise da viabilidade mitocondrial destes parasitos foi realizada após tratamento com os compostos e utilização dos marcadores JC-1 (Figura 13) e Mitotracker (Figura 15 e 17). Observou-se uma perda significativa do potencial de membrana mitocondrial do parasito após tratamento por 120 horas, com ambos os compostos na concentração de 3 μ M, indicando assim que os compostos interferem diretamente no metabolismo energético do parasito. Podemos observar também um arredondamento na estrutura dos parasitos tratados com o composto I (Figura 13C e 13D).

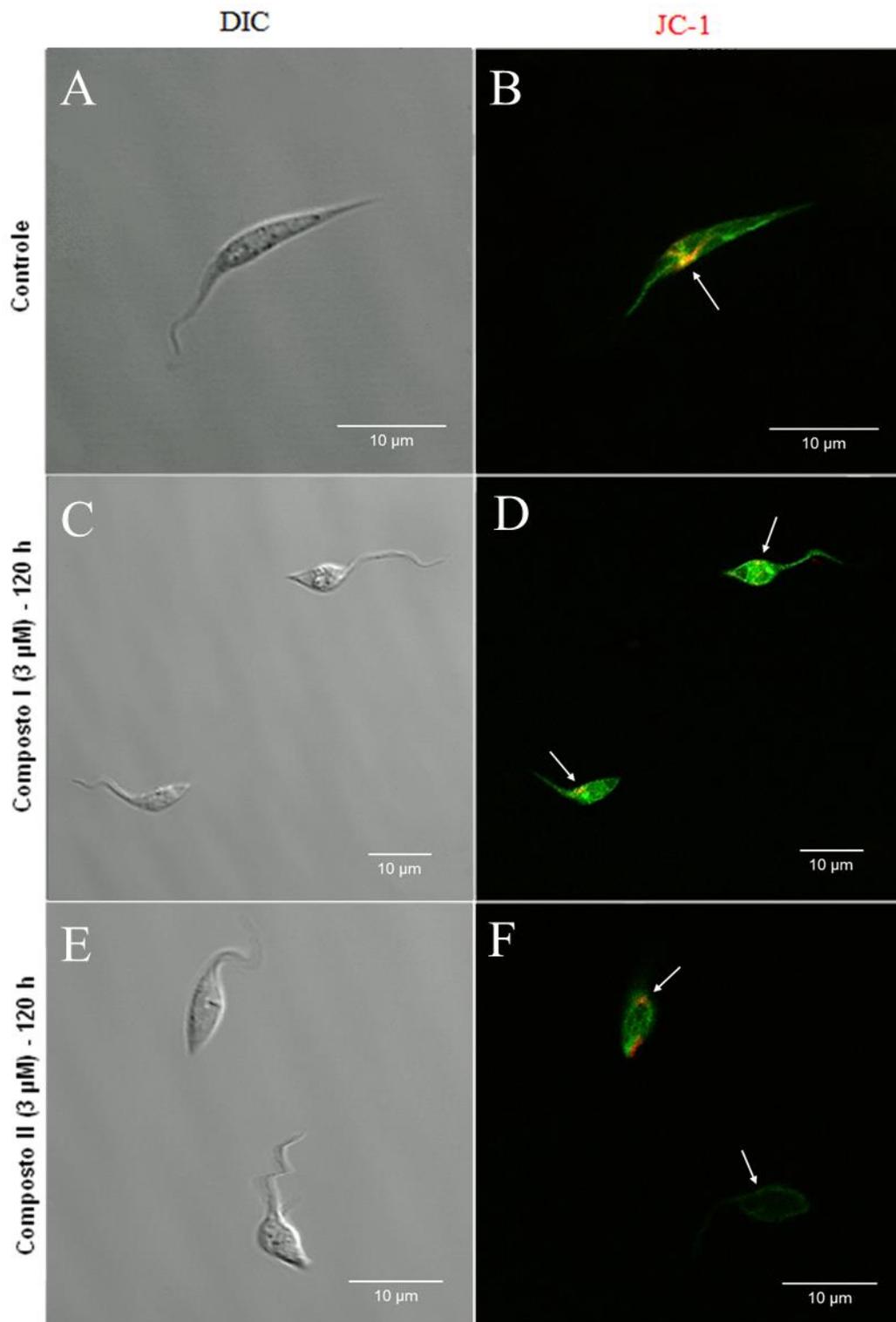


Figura 13 – Imagens de microscopia confocal a laser de parasitos tratados com os compostos I e II, posteriormente incubados com o marcador de viabilidade mitocondrial JC-1. Após tratamento por 120 horas com os compostos I e II na concentração de 3 μM . A, C e E: Imagens de microscopia de contraste interferencial e diferencial. B, D e F: Marcação de JC-1 por microscopia de fluorescência. Os parasitos tratados com o composto I (C e D) e com o composto II (E e F) perdem o potencial de membrana mitocondrial, enquanto parasitos não tratados apresentam normalmente a marcação (A e B) (fluorescência vermelha). Barras: 10 μm .

Os parasitos que sofreram dano mitocondrial foram quantificados, tomando como parâmetro a marcação com JC-1 (vermelha - para células com mitocôndrias ativas), validando assim estes resultados observados, pois 55% dos parasitos apresentaram lesão mitocondrial, enquanto 45% estavam com a mitocôndria funcional após tratamento com o composto II. Após tratamento com composto I, 66% dos parasitos apresentaram lesão mitocondrial, enquanto 34% estavam com a mitocôndria funcional. Nas células que não receberam tratamento com os compostos, 35% dos parasitos apresentavam diminuição em seu potencial de membrana mitocondrial, possivelmente por conta do ciclo celular do parasito (Figura 14).

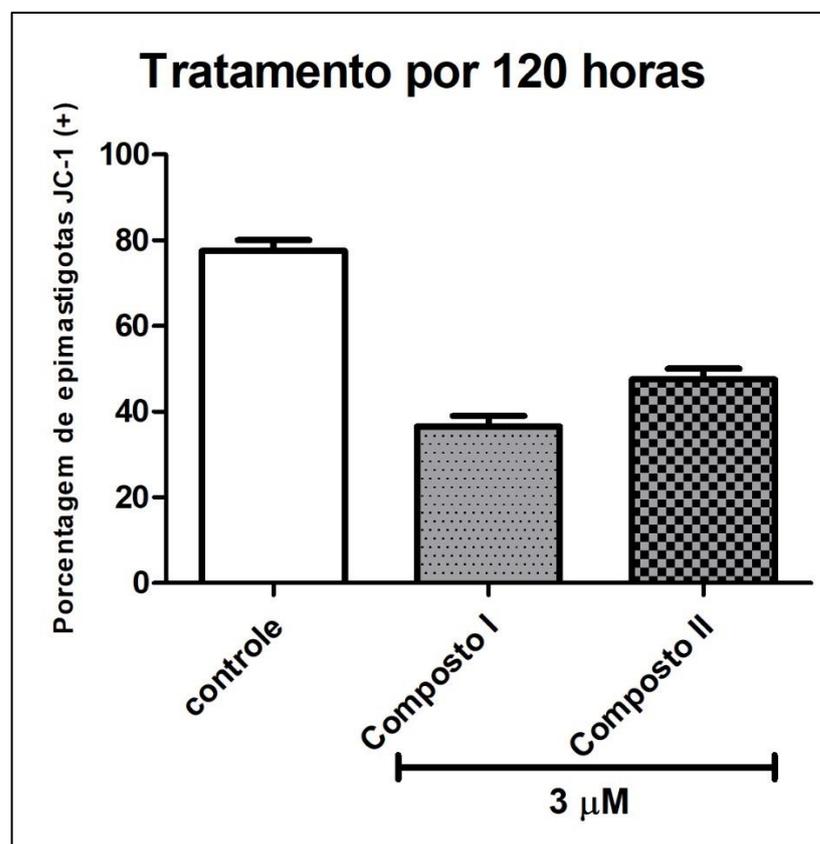


Figura 14 – Quantificação de parasitos não tratados e tratados por 120 horas com os compostos I e II com concentração de 3 µM e posteriormente marcados com JC-1.

Imagens de microscopia de fluorescência de parasitos tratados com os compostos por 24 horas e posteriormente incubados com o marcador MitoTracker Red CMXRos, que foi utilizado para confirmação de viabilidade mitocondrial,

mostraram que em tempos menores de tratamento o parasito não perde significativamente seu potencial de membrana mitocondrial (Figura 15).

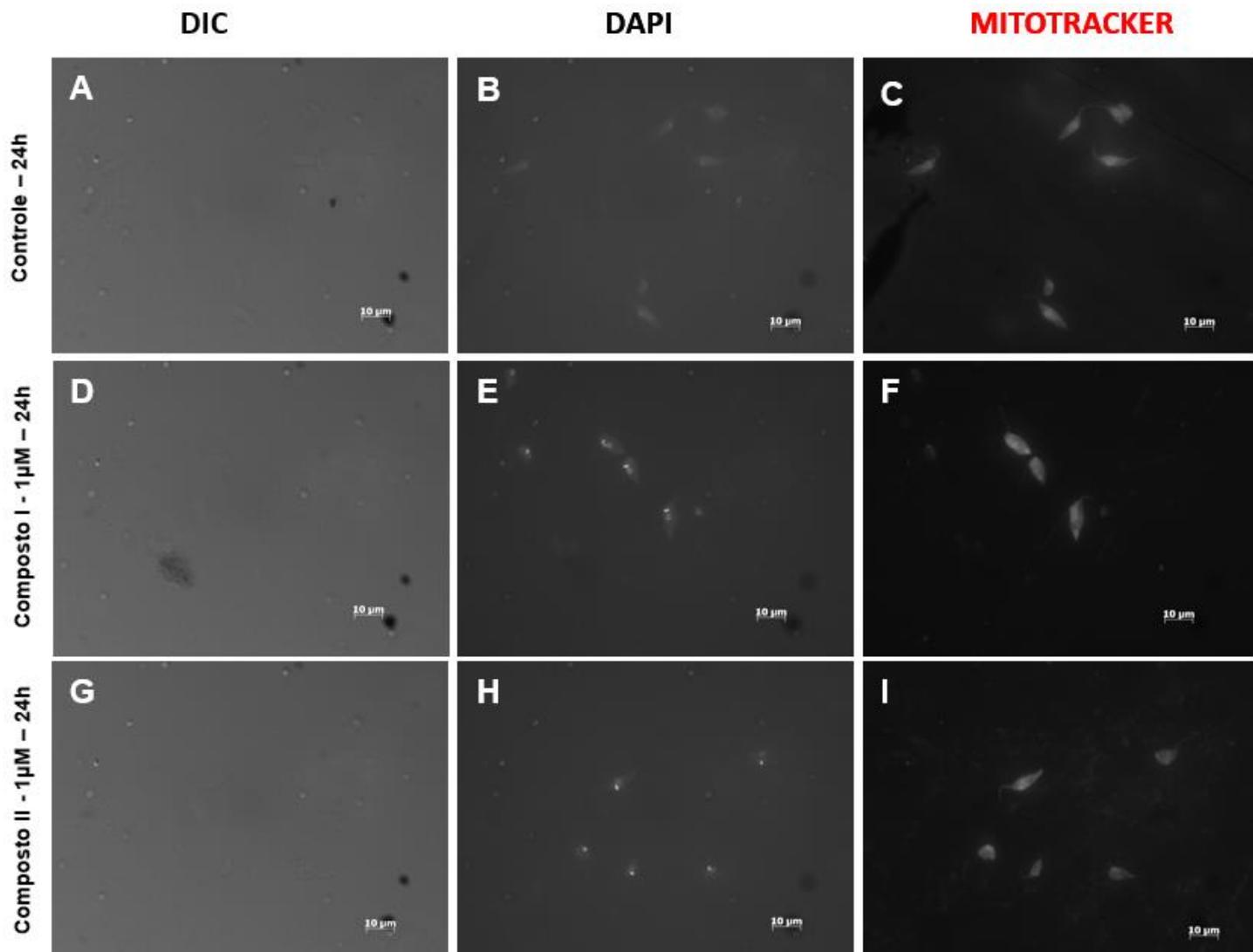


Figura 15 – Imagens de microscopia de fluorescência de parasitos tratados com os compostos e posteriormente incubados com o marcador de viabilidade mitocondrial MitoTracker Red CMXRos. Após tratamento por 24 horas com os compostos I e II na concentração de 1 µM. A, D e G: Imagens de microscopia de contraste interferencial e diferencial. B, E e H: Marcação de DAPI por microscopia de fluorescência. C, F e I: Marcação de MitoTracker Red CMXRos por microscopia de fluorescência. Os parasitos tratados com o composto I (D, E e F) e com o composto II (G, H e I) não perdem significativamente o potencial de membrana mitocondrial assim como foi preservada em parasitos não tratados (A, B e C). Barras: 10 µm.

Os parasitos que não possuíam marcação para potencial de membrana mitocondrial foram quantificados, tomando como parâmetro a intensidade da marcação com MitoTracker Red CMXRos, onde podemos observar que 13% dos

parasitos apresentaram mitocôndria não-funcional, enquanto 87% estavam com a mitocôndria funcional após tratamento com o composto II. O tratamento com composto I fez com que 16% dos parasitos apresentassem redução ou não apresentassem potencial de membrana mitocondrial, enquanto 84% estavam com a mitocôndria funcional. Em células controle, não tratadas, cerca de 7% dos parasitos apresentavam diminuição em seu potencial de membrana mitocondrial, possivelmente por conta do ciclo celular do parasito (Figura 16).

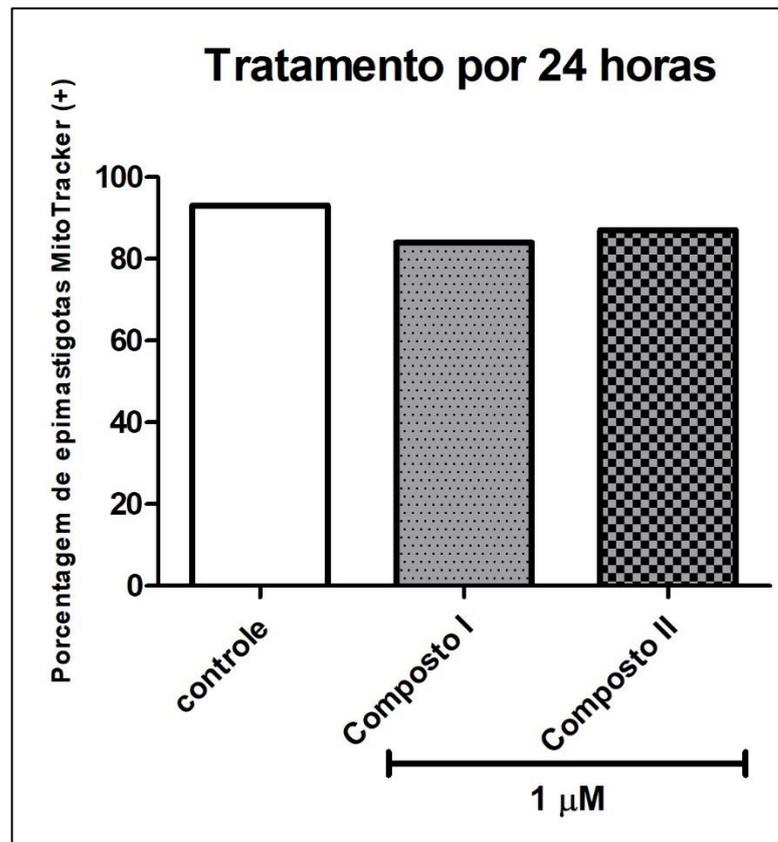


Figura 16 – Quantificação de parasitos não tratados e tratados por 24 horas com os compostos I e II com concentração de 1 µM e posteriormente marcados com DAPI e MitoTracker Red CMXRos.

Imagens de microscopia de fluorescência de parasitos tratados com os compostos por 120 horas e posteriormente incubados com o marcador MitoTracker Red CMXRos, que foi utilizado para confirmação de viabilidade mitocondrial, quando avaliados por meio deste tipo de marcador, não apresentaram tanta diferença em relação às células controle (Figura 17).

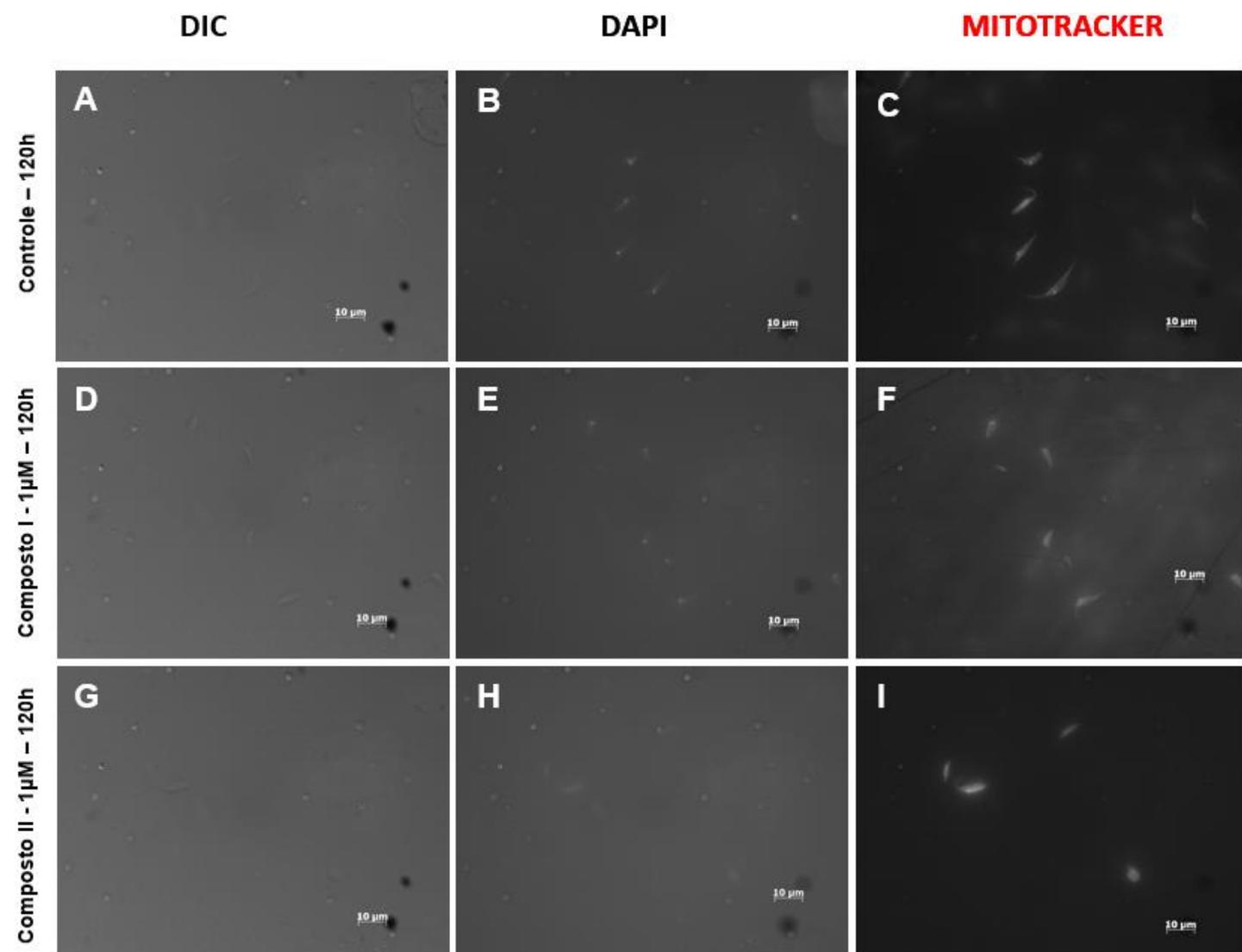


Figura 17 – Imagens de microscopia de fluorescência de parasitos tratados com os compostos I e II, posteriormente incubados com o marcador de viabilidade mitocondrial MitoTracker Red CMXRos. Após tratamento por 120 horas com os compostos I e II na concentração de 1 μ M. A, D e G: Imagens de microscopia de contraste interferencial e diferencial. B, E e H: Marcação de DAPI por microscopia de fluorescência. C, F e I: Marcação de MitoTracker Red CMXRos por microscopia de fluorescência. Os parasitos tratados com o composto I (D, E e F) e com o composto II (G,H e I) perdem o potencial de membrana mitocondrial ao mesmo tempo que foi preservada em parasitos não tratados (A, B e C). Barras: 10 μ m.

Os parasitos que tiveram alterações no potencial de membrana mitocondrial foram quantificados, tomando como parâmetro a intensidade da marcação com MitoTracker Red CMXRos, validando assim estes resultados observados, pois 38% dos parasitos apresentaram mitocôndria não-funcional, enquanto 62% estavam com a mitocôndria funcional após tratamento com o composto II. Após tratamento com composto I, 43% dos parasitos apresentaram lesão mitocondrial, enquanto

57% estavam com a mitocôndria funcional. Nas células que não receberam tratamento com os compostos, 11% dos parasitos apresentavam diminuição em seu potencial de membrana mitocondrial, possivelmente por conta do ciclo celular do parasito (Figura 18).

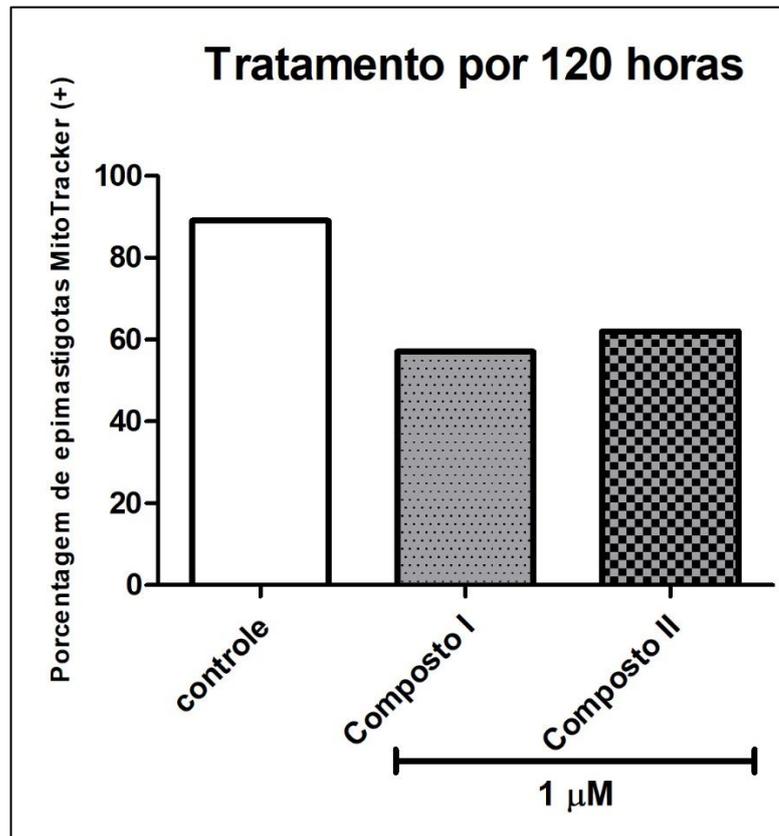


Figura 18 – Quantificação de parasitos não tratados e tratados por 120 horas com os compostos I e II com concentração de 1 μM e posteriormente marcados com DAPI e MitoTracker Red CMXRos.

6. DISCUSSÃO

A DC representa um problema para saúde pública, por sua grande distribuição geográfica e por gerar impacto socioeconômico, além de afetar aproximadamente 18 milhões de pessoas no mundo, principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos (WHO, 2015). Os medicamentos atualmente aceitos para o tratamento da doença são Nifurtimox e Benznidazol. Estes compostos são eficazes contra o tratamento de infecções agudas, mas ineficientes para o tratamento de infecções crônicas devido aos efeitos colaterais provocados e baixo

índice de cura. Estes fármacos não são considerados ideais para tratar a doença, assim se faz necessária a busca e desenvolvimento de melhores formulações, terapias de combinação e novos tratamentos para a DC (JANNIN & VILLA, 2007). Na busca por novos medicamentos há desafios como falta de interesse da indústria farmacêutica, necessidade de validação de novos alvos moleculares, exigência de longo período para obtenção dos compostos de melhor desempenho, necessidade de síntese de compostos inéditos e não somente oriundos de outros já comercializados, completa biblioteca de compostos, e infra estruturada organizada (GIAROLLA & FERREIRA, 2011). Tomando como base a necessidade de desenvolver e testar novos fármacos para tratar a DC, esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito de compostos metálicos contra epimastigotas de *T. cruzi*. Os compostos estudados foram os compostos I e II, e tiveram seus efeitos analisados de maneira mais detalhada apresentando desempenho promissor no desenvolvimento de uma nova terapia.

Os compostos metálicos possuem uma significativa importância no desenvolvimento farmacológico, devido às diversas aplicações em diferentes áreas, principalmente contra agentes infecciosos. Estes compostos apresentam uma grande variedade e peculiaridades químicas, como a reativação do centro metálico em moléculas alvo. Além disto, seus efeitos tóxicos podem ser contornados através de estratégias específicas. As estratégias na terapia contra *T. cruzi* se baseiam em três princípios: coordenação de um ligante metálico com atividade tripanocida, coordenação de compostos metálicos intercalantes de DNA e de compostos inibidores diretos de enzimas do parasito (FRICKER *et al.*, 2008). Estudos mostram que a utilização de compostos em coordenação à metais trazem benefício e agregam vantagens aos fármacos, que se tornam mais ativos que os compostos sozinhos (não coordenados à metais) e mais eficazes que fármacos da clínica, como os compostos de platina e paládio, que foram mais ativos em testes *in vitro* contra a forma epimastigota de *T. cruzi* que o Nifurtimox (OTERO *et al.*, 2006; VIEITES *et al.*, 2011). Nossos resultados mostram que os compostos com núcleo de ferro estudados, compostos I e II apresentaram baixos valor de IC₅₀ para os testes *in vitro* contra a forma epimastigota de *T. cruzi*. PORTES *et al.* (2015), também mostraram o efeito de metalocomplexo com núcleo de ferro sobre taquizoítas de *Toxoplasma gondii in vitro*, por até seis dias de tratamento. Este composto apresentou um valor de IC₅₀ na faixa de micromolar, provocando

alterações no citoplasma e na membrana que indicam morte por apoptose, além de ter induzido cistogênese. Esse composto provocou o aumento de produção de espécies reativas de oxigênio nas células infectadas e tratadas, e foi capaz de controlar a atividade de enzimas antioxidantes importantes para o parasito. Apesar de atingir o *T. gondii*, o composto apresentou baixa citotoxicidade para as células hospedeiras, assim como vimos neste trabalho com os compostos testados. De modo a exceder a capacidade farmacológica dos compostos testados, foram feitas avaliações da citotoxicidade dos compostos em células LLC-MK₂, com até 120 horas de tratamento, com concentrações que variaram de 100 nM à 10 µM. Os compostos, em concentrações mais de 1000 vezes maior do que os valores de IC₅₀, não foram citotóxicos às células LLC-MK₂. Até o momento não foi possível calcular o EC₅₀, pois mesmo na alta concentração de 10 µM dos compostos testados, a citotoxicidade não chegou a 50 %. Assim, a literatura mostra a atividade antiparasitária dos compostos metalocomplexos, como também encontrado no presente trabalho, em que verificamos que os compostos I e II são ativos contra epimastigotas de *T. cruzi* em concentrações na faixa de nanomolar, não apresentando citotoxicidade a células LLC-MK₂.

Para investigar o efeito dos compostos sobre a ultraestrutura do parasito, podem ser utilizadas diferentes metodologias e técnicas. Neste trabalho nós utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão, que permite a observação de organelas e estruturas. Esse tipo de análise pode auxiliar no esclarecimento de questões relacionadas a mecanismos de ação desses quimioterápicos. Menna-Barreto *et al.* (2008), por exemplo, mostraram com a microscopia eletrônica modificações citoplasmáticas semelhantes a alterações em células que estão sofrendo autofagia após tratamento de *T. cruzi* com geranylgeraniol. Lavine & Arrizabalaga (2012) também mostraram utilizando esta técnica, *T. gondii* tratados com monensina. Este tipo de análise foi importante para este trabalho, pois podemos observar alterações importantes na ultraestrutura na forma epimastigota do parasito após o tratamento com um dos metalocomplexos. Os efeitos ultraestruturais foram monitorados nos períodos de 24 a 120 horas para que as alterações pudessem ser observadas desde o início do tratamento. O tratamento com o composto II gerou alterações ultraestruturais importantes como o inchaço e disposição anormal nas mitocôndrias e cinetoplastos (ou DNA mitocondrial) dos tripanosomatídeos. A mitocôndria deste parasito encontra-se intimamente

associada ao cinetoplasto, e abriga diferentes enzimas do metabolismo oxidante e energético e devido as diferenças entre as mitocôndrias de mamíferos e tripanosomatídeos, essa organela é um excelente alvo para intervenções terapêuticas (MENNA-BARRETO & DE CASTRO, 2014). As alterações observadas nessas estruturas após tratamento com os complexos de ferro, foram confirmadas em testes com marcadores de potencial de membrana, MitoTracker e JC-1, que mostraram redução no potencial de membrana desta organela. Esses resultados nos mostram que compostos de ferros testados são capazes de afetar o metabolismo energético do parasito.

O tratamento com ambos os compostos em menores concentrações, na escala nanomolar, gerou alterações importantes nos reservossomos dos epimastigotas de *T. cruzi*, como o rompimento desta organela e o surgimento de cristais em seu lúmen. Os reservossomos são organelas lisossômicas essenciais para o metabolismo energético, que estão presentes na parte posterior dos epimastigotas de *T. cruzi*. Estas organelas são estruturas de membrana arredondada com reservas lipídicas em seu lúmen denso de elétrons (SANT'ANNA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 1992). Proteases do lisossomo, como a cruzipaina, principal cisteína protease do *T. cruzi* (CAZZULO *et al.*, 1990), estão concentradas nos reservossomos, para digerir o material endocitado, embora os reservossomos também sejam capazes de armazenar macromoléculas, como o colesterol, para mobilização futura quando necessário (PEREIRA *et al.*, 2011). Estes resultados nos mostram que compostos de ferro testados afetaram organelas de reserva de nutrientes e metabólitos dos parasitos.

Estudos sobre os mecanismos de lesão oxidativa confirmam a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. O ferro, por exemplo, é o metal pesado mais abundante no organismo e catalisa reações de oxidação de biomoléculas (AUST *et al.*, 1991). O estresse oxidativo é definido como uma situação em que o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é interrompido. A principal fonte de estresse oxidativo nos organismos vivos são as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são moléculas, como o peróxido de hidrogênio, o superóxido e os radicais hidroxila, derivados do oxigênio e altamente reativos às biomoléculas (WINTERBOURN *et al.*, 2008). O excesso de ferro está associado às ROS, pois a abundância de ferro em ambiente rico em oxigênio apresenta condições favoráveis à reação de Fenton, levando à formação de ROS por essa

via. Além desta forma, a morte celular também pode ocorrer por peroxidação lipídica motivada pelo excesso de ferro e consequente geração de ROS (XIE *et al.*, 2016). O ferro e as ROS são mediadores importantes da morte celular em muitos organismos e o excesso de ferro está associado a um aumento de morte celular por apoptose, necrose e autofagia (DIXON E STOCKWELL, 2014). As ROS mitocondriais são um importante fator desencadeador da apoptose não induzida, que resulta na peroxidação de cardiolipinas, que são fosfolípídeos que compõem a membrana mitocondrial interna, e na libertação do citocromo c para ativar a caspase-3/7 (FORTES *et al.*, 2012). O gênero *Trypanosoma* apresenta sistemas antioxidantes deficientes quando comparados a mamíferos, podendo este ser um alvo importante para desenvolvimento de novos fármacos que inibam a ação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (TURRENS, 2004). A superóxido dismutase é responsável por catalisar a transformação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, através de reações alternadas de redução e de oxidação do metal do sítio ativo da enzima (LUDWIG, 1991). Assim, a inibição desta enzima provoca um estresse oxidativo no parasito pelo acúmulo do íon superóxido. As enzimas superóxido dismutase são classificadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo. Assim como os metalocomplexos analisados neste trabalho, a enzima superóxido dismutase do *T. cruzi*, contém um átomo de ferro em seu sítio ativo, ausente em células de eucariotos, o que justifica o interesse sobre fármacos que atuam sobre esta enzima no parasito (LE TRANT *et al.*, 1983). O mecanismo de ação dos compostos de ferro pode ocorrer via inibição da enzima superóxido dismutase, levando a um aumento do nível de radicais superóxido e a consequente morte do parasito (RAYCHAUDRURY *et al.*, 2005). Além disso, o peróxido de hidrogênio formado no meio intracelular é removido em células de mamíferos por ação da catalase e de outras peroxidases, já os tripanossomatídeos, como não dispõem ou dispõem de baixas concentrações de catalase e glutathione peroxidase, sofrem com acúmulo de peróxido de hidrogênio que gera morte dos mesmos como consequência do estresse oxidativo (LEID *et al.*, 1989; FLOHE *et al.*, 2003).

Apesar da eficácia *in vitro* desses compostos metálicos de ferro, muitas questões permanecem sem resposta a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na ação dos mesmos contra o *T. cruzi*. Porém, estes resultados abrem perspectivas interessantes para a investigação da eficácia dos compostos em

modelo de infecção *in vivo*, bem como para uma descrição mais completa do mecanismo de ação dos compostos sobre o parasito.

7. CONCLUSÃO

A partir de resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho e consultas à literatura recente é possível concluir que os compostos metalocomplexos de ferro são ativos contra epimastigotas de *T. cruzi*, pois:

- Os compostos I e II foram capazes de controlar o crescimento do parasito na forma epimastigota mantida *in vitro*.
- Os valores de IC₅₀ para o composto I foram 97.71, 66.29 e 147.53 nM, para os tempos de 72, 96 e 120 horas de tratamento, respectivamente e para o composto II foram 122.76, 69.27 e 104.17 nM, para os mesmos tempos de tratamento;
- Os compostos I e II não apresentaram citotoxicidade significativa a células LLC-MK2;
- O composto II gerou alterações em organelas importantes do parasito, apresentando inchaço e disposição anormal nas mitocôndrias e cinetoplastos. Observou-se também o aparecimento de vesículas de natureza desconhecida;
- Os compostos I e II foram capazes de reduzir o potencial de membrana mitocondrial do parasito.
- Os compostos I e II provocaram alterações nos reservossomos, degradando sua estrutura e formando de cristais em seu interior.

Assim, os efeitos desses compostos podem ser estudados de maneira mais detalhada com o objetivo de propor novas alternativas terapêuticas para resolução do tratamento contra a doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, [S.l.], v. 116, p. 44-52, 2007.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S.P.; KATZ, L.; CAGLIOTI, S.; SHAMER, S. Chagas disease and the US blood supply. **Current Opinion in Infectious Disease**, [S.l.], v. 21, p. 476-482, 2008.
- BORGES, L.J.H.; BULL, É.S.; FERNANDES, C.; HORN, A. JR.; AZEREDO, N.F.; RESENDE, J.A.L.C.; FREITAS, W.R.; CARVALHO, E.C.Q.; LEMOS, L.S.; JERDY, H.; KANASHIRO, M.M. In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 123, p. 128-140, 2016.
- BOSCARDIN, S.; TORRECILHAS, A.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; GONZALEZ-REY, E.; TONELLI, R.; SILBER, A. Chagas' disease: an update on immune mechanism and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S.l.], v. 14, p. 1-42, 2009.
- BRENNER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 2000.
- BRUIJNINCX, C.A.; SADLER, P.J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S.l.], v. 12, p. 1–10, 2010.
- BUCKNER, F.S.; GRIFFIN, J.H.; WILSON, A.J.; VAN VOORHIS, W.C. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 45, p. 1210-1215, 2001.
- CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Structure and Function**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 383–392, 1989.
- CASTRO, D.P.; SEABRA, S.H.; GARCIA, E.S.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm

- formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, [S.l.], v. 117, p. 201-207, 2007.
- CAZZULO, J.J.; CAZZULO FRANKE, M.C.; MARTINEZ, J.; FRANKE DE CAZZULO, B.M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1037, p. 186–191, 1990.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Chagas disease. Georgia, 2015.
- CHAGAS, C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHAMOND, N.; COATNOAN, N.; MINOPRIO, P. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. **Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders**, [S.l.], v. 2, p. 247-254, 2002.
- CINQUE, G.M.; SZAJNMAN, S.H.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R.; SCHVARTZAPEL, A.J.; RODRIGUEZ, J.B.; GROS, E.G. Structure-activity relationship of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 41, p. 1540-1554, 1998.
- CORY, A.H.; OWEN, T.C.; BARLTROP, J.A.; CORY, J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, v. 3 (7), p. 207-212, 1991.
- COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is need - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, suppl. 1, p. 113-122, 2007.
- COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, 641, 2011.
- DOCAMPO, R.; STOPPANI, A.O. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 197, p. 317-321, 1979.

- DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. The evolution of Chaga's Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 103-121, 1999.
- DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, suppl.1, p. s13-s22, 2007
- DIAS, J.P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A.V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, p. 296-300, 2008.
- DIXON, S.J.; STOCKWELL, B.R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 9-17, 2014.
- FAIRLAMB, A.H. Future prospects for the chemotherapy of Chaga's disease. **Medicina**, Buenos Aires, v. 59, p. 179, 1999.
- FERNANDES, C.; HORN, A. JR.; LOPES, B.F.; BULL, E.S.; AZEREDO, N.F.B.; KANASHIRO, M.M.; BORGES, F.V.; BORTOLUZZI; A.J.; SZPOGANICZ, B.; PIRES, A.B.; FRANCO, R.W.A.; ALMEIDA, J.C.A.; MACIEL, L.L.F.; RESENDE, J.A.L.C.; SCHENK, G. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 68-87, 2015.
- FLOHE, L.; JAEGER, T.; PILAWA, S.; SZTAJER, H. Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function. **Redox Report**, v. 8, p. 256-264, 2003.
- FORTES, G.B.; ALVES, L.S.; DE OLIVEIRA, R.; DUTRA, F.F.; RODRIGUES, D.; FERNANDEZ, P.L.; SOUTO-PADRON, T.; DE ROSA, M.J.; KELLIHER, M.; GOLENBOCK, D.; CHAN, F.K.; BOZZA, M.T. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. **Blood**, v. 119, p. 2368-2375, 2012.
- FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; DOU, Q.P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for

- CancerTherapy. **Current Pharmaceutical Design**, [S.I.], v. 16, p. 1813-1825, 2010.
- FRICKER, S.P. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton Transactions**, [S.I.], v. 43, p. 4903-4917, 2007.
- GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, [S.I.], v. 53, p. 11-21, 2007.
- GUERRA, W.; AZEVEDO, E.A.; MONTEIRO, A.R.S.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A.; FONTES, A.P.S.; LE MOYEC, L.; PEREIRA-MAIA, E.C. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three paladium(II) complexes of tetracyclines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S.I.], v. 99, p. 2348-2354, 2005.
- HUBIN, T.J.; AMOYAW, P.N.; ROEWE, K.D.; SIMPSON, N.C.; MAPLES, R.D.; CARDER FREEMAN, T.N.; CAIN, A.N.; LE, J.G.; ARCHIBALD, S.J.; KHAN, S.I.; TEKWANI, B.L.; KHAN, M.O. Synthesis and antimalarial activity of metal complexes of cross-bridged tetraazamacrocyclic ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 22, p. 3239-3244, 2014.
- LE TRANT, N.; MESHNICK, D.R.; KITCHENER, K.; EATON, J.W.; CERAMI, A. Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 125-130, 1983.
- LEID, R. W.; SUQUET, C. M.; TANIGOSHI, L. Oxygen detoxifying enzymes in parasites: a review. **Acta Leidensia**, v. 57, p.107-104, 1989.
- LUDWIG, M.L.; METZGER, A.L.; PATTRIDGE, K.A.; STALLINGS, W.C. Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 209, p. 335-358, 1991.
- MACEDO-SILVA, S.T.; SILVA, T.L.A.O.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects

- of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonenses*. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 12, 2011.
- MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS JÚNIOR, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, Rio de Janeiro, v. 130, p. 167-74, 2014.
- MENDES, I.C.; MOREIRA, J.P.; ARDISSON, J.D.; DOS SANTOS, R.G.; DA SILVA, P.R.O.; GARCIA, I.; CASTIÑEIRAS, A.; BERALDO, H. Organotin(IV) complexes of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: Antimicrobial and cytotoxic effects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 43, p. 1454-1461, 2005.
- MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, [S.I.], v. 100, p. 663-677, 2006.
- MOREL, C.M. Chagas disease, from discovery to control- and beyond: history, myths and lessons to take home. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 3-16, 1999.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**, São Paulo: Atheneu, v. 11, 2005.
- NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W.N. Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açai Palm Fruit, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, [S.I.], v. 15, p. 653-655, 2009
- NOGUEIRA, N.F.S.; GONZALEZ, M.S.; GOMES, J.E. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, [S.I.], v. 116, p. 120-128, 2007.
- NUNES, M.C.; DONES, W.; MORILLO, C.A.; ENCINA, J.J.; RIBEIRO, A.L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, [S.I.], v. 62(9), p. 767-776, 2013.
- NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.I.], v. 5, p. 941-955, 2006.

- ORVIG, C.; ABRAMS, M.J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 99(9), p. 2201-2204, 1999.
- PEREIRA, M.G.; NAKAYASU, E.S.; SANT'ANNA, C.; DE CICCO, N.N.; ATELLA, G.C.; DE SOUZA, W.; ALMEIDA, I.C.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. **PLoS ONE**, v. 6, e22359, 2011.
- PÉREZ-REBOLLEDO, A.; AYALA, J.D.; DE LIMA, G.M.; MARCHINI, N.; BOMBIERI, G.; ZANI, C.L.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; BERALDO, H. Structural studies and cytotoxic activity of N(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone Sn(IV) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 40, p. 467-472, 2005.
- POOT, M.; ZHANG, Y.Z.; KRAMER, J.A.; WELLS, K.S.; JONES, L.J.; HANZEL, D.K.; LUGADE, A.G.; SINGER, V.L.; HAUGLAND, R.P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, nº 12, p. 1363-1372, 1996.
- PORTES, J.A.; SOUZA, T.G.; DOS SANTOS, T.A.; DA SILVA, L.L.; RIBEIRO, T.P.; PEREIRA, M.D.; HORN, A.JR.; FERNANDES, C.; DAMATTA, R.A.; DE SOUZA, W.; SEABRA, S.H.; Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, [S.I.], v. 59, n. 12, p. 7374-7386, 2015.
- PORTES, J.A.; MOTTA, C.S.; AZEREDO, N.F.; FERNANDES, C.; HORN, A.JR.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R.A.; SEABRA, S.H.; *In vitro* treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. **Veterinary Parasitology**, v. 245, p. 141-152, 2017.
- PORTES, J.A.; AZEREDO, N.F.; SIQUEIRA, P.G.T.; SOUZA, T.G.; FERNANDES, C.; HORN, A.JR.; CANDELA, D.R.S.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R.A.; SEABRA, S.H.; A new iron(III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 117, p. 2795-2805, 2018.
- RASSI JÚNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas Disease. **The Lancet**, Reino Unido, v. 375, p. 1387-1402, 2010.

- RASSI JÚNIOR, A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J.M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, [S.l.], v. 26, p. 275-291, 2012.
- RAYCHAUDRURY, B.; BANERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R.V.; DATTA, S.C. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, v. 95, p. 1-8, 2005.
- REA, A.; TEMPONE, A.G.; PINTO, E.G.; MESQUITA, J.T.; RODRIGUES, E.; SILVA, L.G.M.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. Soultamarin Isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) Induces Plasma Membrane Permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and Mitochondrial Dysfunction. **PLOs Neglected Tropical Diseases**. V. 7, 2013.
- REERS, M.; SMILET, S.T.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; CHEN, A.; LIN, M.; CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymology*. v. 260, p. 406-417, 1995.
- SANT'ANNA, C.; PEREIRA, M.G.; LEMGRUBER, L.; DE SOUZA, W.; CUNHA E SILVA, N.L. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, p. 599–605, 2008.
- SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas Disease control. **Trends in Parasitology**, [S.l.], v. 22, p. 583-588, 2006.
- SILVA, L.H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**. V. 20, p. 191-207, 1953.
- SILVEIRA, A.C.; DIAS, J.C.P. O controle da transmissão vetorial. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, p. 52-63, 2011.
- SOARES, M.J.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 102, p.157–167, 1992.
- SONG, D.; LINDOSO, J. A. L.; OYAFUSO, L. K.; KANASHIRO, E. H. Y.; CARDOSO, J. L.; UCHOA, A. F.; TARDIVO, J. P.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 29, p. 711-715, 2011.

- TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M. & WITTNER, M. Chagas' Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 5, p. 400-419, 1992.
- TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, [S.l.], v. 82(974), p. 788-798, 2006.
- TONG, W.; LOWIS, D.R.; PERKINS, R.; CHEN, Y.; WELSH, W.J.; GODDETTE, D.W.; HERITAGE, T.W.; SHEEHAN, D.M. Evaluation of quantitative structure-activity relationship methods for large-scale prediction of chemicals binding to the estrogen receptor. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, v. 38, p. 669-677, 1998.
- TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211-220, 2004.
- VAN RIJT S.H.; SADLER, P.J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discov Today**, [S.l.], v. 14, p. 1089–1097, 2009.
- VERONESI, R. Doenças Infecciosas e parasitárias. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 1082, 1991.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M.G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Reviews of Anti-infective Therapy**, [S.l.], v. 7, p. 157-163, 2009.
- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization**, Geneva, Fact Sheet N^o: 340, p. 1-4, 2015.
- WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 278–286, 2008.
- WRIGHT, G.D.; SUTHERLAND, A.D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in molecular medicine**, [S.l.], v. 13(6), p. 260-267, 2007.

XIE, Y.; HOU, W.; SONG, X.; YU, Y.; HUANG, J.; SUN, X.; KANG, R.; TANG, D.
Ferroptosis: process and function. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, p.
369-379, 2016.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 101–107,
2009.