

**Avaliação *in vitro* da atividade antiparasitária e dos aspectos morfológicos da  
eliminação do *Trypanossoma cruzi* intracelular na presença de tiosemicarbonas e seus  
derivados 4-Tiazolidinona**

**LAÍS PESSANHA DE CARVALHO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
ABRIL 2015

**Avaliação *in vitro* da atividade antiparasitária e dos aspectos morfológicos da  
eliminação do *Trypanosoma cruzi* intracelular na presença de tiosemicarbazonas e seus  
derivados 4-Tiazolidinona**

**LAÍS PESSANHA DE CARVALHO**

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 Mestre em Biociência  
e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
ABRIL 2015

**Avaliação *in vitro* da atividade antiparasitária e dos aspectos morfológicos da  
eliminação do *Trypanosoma cruzi* intracelular na presença de tiosemicarbazonas e seus  
derivados 4-Tiazolidinona**

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 Mestre em Biociência e  
Biotecnologia.

Aprovada em 07 de Abril de 2015.

Comissão examinadora:

---

Prof. Dr. Fernando Costa e Silva (UENF)

---

Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho (UENF)

---

Prof. Dr. Ulysses Garcia Casado Lins (UFRJ)

---

Prof. Dr. Edésio J. T. de Melo (orientador) (UENF)

### **Agradecimentos:**

Primeiramente ao Professor Edésio por ser o idealizador deste trabalho e ter me dado todas as condições necessárias para realizá-lo. Obrigada por todo apoio, incentivo, crédito, amizade e pelo conhecimento que vem me passando.

À toda minha família por ser tão presente em minha vida.

Às colegas de laboratório pela paciência e convivência diárias.

Às técnicas do LBCT por colaborarem com a realização deste trabalho.

Aos professores que efetivamente colaboraram para o cumprimento desta etapa.

À todas as pessoas e amigos que se fizeram presentes durante todo este tempo.

À todos, o meu muito obrigada. Tudo seria mais difícil sem vocês.

Às agências de fomento CNPq, FAPERJ e a UENF.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
<b>1 Introdução .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Ciclo de vida.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Ciclo morfo genético do parasito .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Processo de interação parasito - célula hospedeira .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Adesão e reconhecimento.....	8
1.4.2 Sinalização .....	10
1.4.3 Invasão .....	10
1.4.4 Escape para o citoplasma .....	12
1.4.5 Multiplicação no citoplasma .....	13
1.4.6 Ruptura da célula hospedeira: .....	13
<b>1.5 Aspectos da morfologia e ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Mecanismos de sobrevivência do parasito .....</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Quimioterapia para doença de Chagas .....</b>	<b>18</b>
<b>1.8 Ribonucleotídeo Redutase (RNR).....</b>	<b>21</b>
<b>1.9 Semicarbazonas, Tiosemicarbazonas e 4-Tiazolidinonas.....</b>	<b>22</b>
<b>2.0 Histórico dos testes utilizando as Semicarbazonas, Tiosemicarbazonas e 4-Tiazolidinonas.....</b>	<b>23</b>
<b>2 Relevância do trabalho .....</b>	<b>26</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>4 Metodologia.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Células hospedeiras .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa DM28).....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Compostos sintéticos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Tratamentos das células e parasitos .....</b>	<b>29</b>
4.4.1 Teste de reversibilidade:.....	29
<b>4.5 Microscopia óptica:.....</b>	<b>29</b>
4.5.1 Análises quantitativas e morfológicas:.....	29
4.5.2 Ensaio com fluorescência para observação de organelas e fenômenos celulares .....	30
<b>5 Resultados .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Análises quantitativa e estrutural .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Análise ultraestrutural .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Aspectos celulares da eliminação do parasito .....</b>	<b>40</b>
<b>6 Discussão .....</b>	<b>45</b>
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>49</b>

<b>Apêndice.....</b>	<b>59</b>
----------------------	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Representação do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos seus hospedeiros invertebrado e vertebrados. ....	5
<b>Figura 2</b> Representação esquemática das três principais formas encontradas do parasito e seus característicos posicionamentos do cinetoplasto em relação ao núcleo. ....	7
<b>Figura 3</b> Esquema representativos dos mecanismos envolvidos no processo de invasão do tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> e do ciclo intracelular do parasito. ....	14
<b>Figura 4</b> Representação da estrutura molecular das duas atuais drogas usadas no tratamento da tripanosomíase Americana. ....	19
<b>Figura 5</b> Esquema da estrutura da enzima Ribonucleotídeo Redutase com suas duas subunidades. ....	21
<b>Figura 6</b> Representação esquemática das duas classes de drogas. ....	22
<b>Figura 7</b> Esquema das estruturas moleculares dos compostos usados nos outros testes do grupo. ....	24
<b>Figura 8</b> Esquema das estruturas dos compostos utilizados no presente estudo e seus respectivos radicais. ....	25
<b>Figura 9</b> Efeito do composto 1 (TSC) sobre a multiplicação do <i>T. cruzi</i> intracelular.....	36
<b>Figura 10</b> Teste de reversibilidade nas células Vero infectadas com <i>T. cruzi</i> por 24 h e incubadas com o composto 1 a 1 mM. ....	38
<b>Figura 11</b> Análise ultraestrutural de células Vero infectadas com amastigotas de <i>T. cruzi</i> por 72 h.....	40
<b>Figura 12</b> Células Vero infectadas com amastigotas de <i>T. cruzi</i> por 36 h e coradas com LA. ....	41
<b>Figura 13</b> Células Vero infectadas com amastigotas de <i>T. cruzi</i> por 36 h e coradas com LysoTracker Red. ....	42
<b>Figura 14</b> Células Vero infectadas com amastigotas de <i>T. cruzi</i> por 36 h e coradas com Monodansilcadaverina. ....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 Lista dos radicais utilizados nos compostos testados pelo grupo e suas respectivas atividades antimicrobianas.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 2 Cultura de células Vero infectadas com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> por 48 h e tratadas com os compostos de 1-14, as drogas de referência e as diferentes concentrações.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 3 Radicais utilizados nos análogos das tiosemicarbazonas (em negrito) e tiazolidinonas em ordem decrescente de efeito após o tratamento com 1 mM por 24 h.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 4 Valores de LD 50 (mM) para as amastigotas e para as células Vero, após o tratamento com os 16 compostos por 24 h. ....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 5 Porcentagem de infecção e número de amastigotas nas células Vero após diferentes tempos de tratamento com o composto 1 a 1 mM. ....</b>	<b>37</b>



## RESUMO

*Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, é um protozoário parasito intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de células nucleadas. Dentro destas células, o *T. cruzi* realiza seu ciclo de replicação levando à ruptura da célula hospedeira. Os parasitos liberados caem na corrente sanguínea, onde poderão infectar novas células, propagando a infecção e ocasionando a doença. A doença de Chagas tem uma alta incidência na América Central e do Sul, contudo só existe tratamento para fase aguda da doença, que consiste em duas drogas nitrogenadas chamadas Nitrofuran (Nifurtimox) e Benzonidazol cujos efeitos colaterais são bastante severos aos humanos. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de 14 compostos pertencentes às classes Tiosemicarbonas e 4-Tiazolidinonas sobre a multiplicação dos parasitos intracelulares e mecanismos celulares envolvidos na eliminação do *T. cruzi*. Estas duas classes já vêm sendo bastante utilizadas em testes contra uma grande variedade de microorganismos e células cancerígenas, devido às propriedades bem conhecidas como inativação de enzimas metálicas, inclusive a Ribonucleotídeo Redutase, uma das responsáveis pela replicação do DNA. Os ensaios feitos no presente trabalho mostraram que todos os compostos testados tiveram ação anti- *Trypanosoma cruzi* nas concentrações testadas, induzindo a diminuição da infecção devido à eliminação do patógeno intracelular. Análises utilizando tanto a microscopia óptica quanto a eletrônica de transmissão mostraram que o tratamento com os compostos levou a uma progressiva e irreversível destruição do parasito que possibilitou sua eliminação. Estas análises também sugeriram que um dos mecanismos celulares responsáveis pela eliminação do *T. cruzi* é a autofagia.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease is an obligate protozoan parasite able to infect a wide variety of eukaryotic cells. Inside these cells, *T. cruzi* replicates leading to host cell rupture. These parasites reach the bloodstream where they can infect other cells, spreading the infection and causing the disease. Chagas' disease has a high incidence in Central and South America, however there is treatment only to the acute phase of the disease. The treatment is based on nitrogen drugs, Nitrofurantoin and Benznidazole, whose side effects are extremely severe in Humans. Therefore, the goal of this study was to evaluate the activity of 14 compounds belonging to Thiosemicarbazone and 4-Thiazolidinone classes over the multiplication of intracellular parasites and cellular mechanisms involved in the elimination of *T. cruzi*. These two classes of drugs are frequently tested against a wide variety of microorganisms and cancer cells, because to their well-known properties for metallic enzyme inactivation, including Ribonucleotide Reductase, responsible for DNA replication. The assays done in this work showed that all compounds tested had anti-*Trypanosoma cruzi* activity with the concentrations used, leading to a decrease of infection because of the intracellular pathogen elimination. Analyses using optical and transmission electron microscopy showed that the treatment with the compounds led to a progressive and irreversible destruction of the parasite that enabled their elimination. These analyses also suggested that one of the cellular mechanism responsible to *T. cruzi* elimination is autophagy.

## 1 Introdução

Parasitas intracelulares como vírus (ex. vírus da imunodeficiência humana), fungos (ex. *Aspergillus* sp., *Candida* sp.) bactérias (ex. *Mycobacterium tuberculosis*) e protozoários (ex. *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* sp.) são conhecidos agentes etiológicos de importantes doenças de interesse médico e veterinário. A incidência destas doenças somada com a ausência ou ineficácia de tratamento causa um alto número de mortes anualmente.

Embora haja uma diversificação na preferência celular, os mecanismos de invasão, estabelecimento da infecção e estratégias de sobrevivência intracelular utilizados pelos patógenos apresentam várias semelhanças.

### 1.1 *Trypanosoma cruzi*

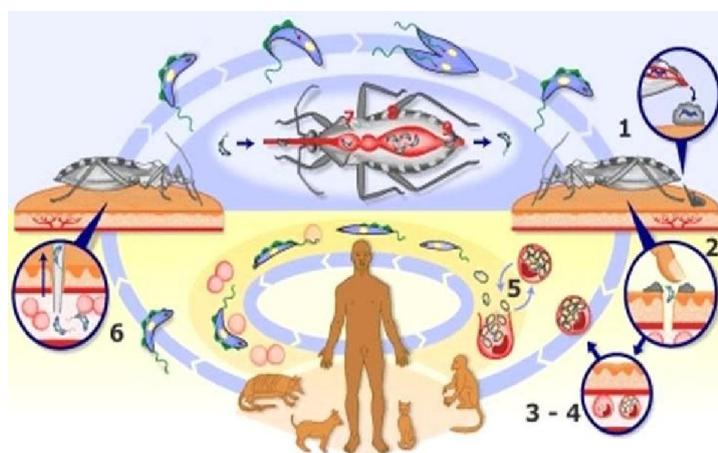
O *Trypanosoma cruzi*, protozoário da ordem dos cinetoplastídeos, é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar muitos tipos de células nucleadas de hospedeiros vertebrados, mas possui um tropismo pela musculatura lisa e cardíaca. O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana em humanos e foi descoberto e primeiramente estudado por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). Este parasito possui um complexo ciclo de vida que envolve um hospedeiro invertebrado da família dos triatomíneos e um vertebrado (mamíferos, incluindo o homem), onde diferentes estágios morfológicos podem ser encontrados (SANCHÉZ-VALDÉZ *et al.*, 2013).

A doença de Chagas constitui um sério problema de saúde pública por ser uma das principais doenças parasitárias da região da América Central e do Sul. Aproximadamente sete milhões de pessoas estão infectadas com o parasito em todo o mundo (WHO, 2014). A fase aguda da doença é caracterizada pela grande quantidade de tripomastigotas circulantes no sangue, enquanto na fase crônica há um elevado número de anticorpos na circulação e o surgimento das patologias consequentes da infecção. O tratamento da doença de Chagas é feito através do uso do Nifurtimox ou Benzonidazol, no entanto estas drogas não são completamente eficazes na eliminação do parasito além de induzirem graves efeitos colaterais nos pacientes (GERPE, *et al.*, 2010).

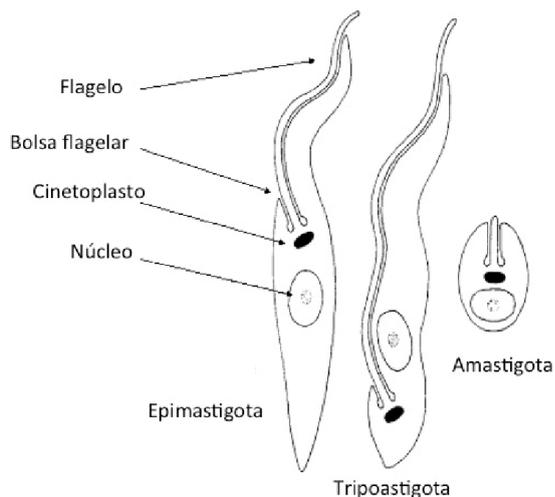
## 1.2 Ciclo de vida

O hospedeiro definitivo do parasito é um inseto hematófago da subfamília dos triatomíneos (Hemiptera e Reduvidae) que quando infectado, ao alimentar-se de um hospedeiro vertebrado, libera em suas fezes o parasito na forma de tripomastigota metacíclico (Fig. 1 – 1). O contato do parasito com escoriações locais ou mucosas (Fig. 1 – 2) o possibilita atingir os tecidos do vertebrado tornando-o capaz de infectar uma grande variedade de células de mamíferos através de interações moleculares e diferentes mecanismos de invasão (Fig.1 – 3 e 4). No interior destas células, os tripomastigotas permanecem temporariamente (aproximadamente 8 horas) no vacúolo parasitóforo até que passam para o citoplasma. No citoplasma é onde ocorre o processo de transformação dos tripomastigotas em amastigotas, a forma proliferativa intracelular. Após, aproximadamente, 9 ciclos de replicação (cujo tempo é dependente da cepa – a DM 28 leva, aproximadamente, 14 horas para o primeiro ciclo e, entre 8-10 para os seguintes) ocorre a transformação de amastigotas para tripomastigotas que romperão a célula e serão liberados no espaço intercelular e alcançarão a corrente sanguínea para prosseguir com a infecção (TYLER e ENGMAN, 2001) (Fig. 1 – 5). Uma vez que um triatomíneo se alimenta do sangue de um indivíduo infectado, o inseto pode adquirir o parasito, majoritariamente, na forma tripomastigota (Fig. 1 – 6). Ao atingir o intestino médio do inseto, o *T. cruzi* adquire a forma de amastigota e em sequência a forma de epimastigota. Somente na porção posterior do intestino que o parasito passa para a forma tripomastigota metacíclica, já próximo de ser excretado por este hospedeiro. Assim, no próximo repasto, estes parasitos serão liberados para infectar novos mamíferos (Fig. 1) (OSÓRIO; *et al.*, 2012).

Figura 1 Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos seus hospedeiros invertebrado e vertebrados. Adaptado de OSÓRIO; *et al.*, 2012.



Logo após o Homem adquirir o parasito, dá-se início a fase aguda da doença que, na maioria das vezes, é assintomática, mas pode apresentar sintomas como: febre baixa, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Depois de alguns meses, a infecção



passa a ser crônica e assintomática para a maioria dos pacientes, contudo alguns desenvolvem problemas cardíacos e digestivos que podem causar a morte do indivíduo.

### 1.3 Ciclo morfofénico do parasito

Um aspecto celular deste protozoário inclui as três formas morfológicas que se relacionam e podem ser distinguidas no microscópio óptico pela

posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela presença ou não de flagelo. O parasito é uma célula polarizada, onde a porção do corpo flagelar define sua polaridade. As três formas bem conhecidas são (Figura 2):

A forma epimastigota está presente no tubo digestivo dos hospedeiros definitivos (triatomíneos) e possui baixa infectividade para os vertebrados. Os epimastigotas possuem forma alongada, e um flagelo que emerge da porção lateral e permanece aderido ao corpo do parasito. O cinetoplasto, também alongado, encontra-se na região anterior ao núcleo (DE SOUZA, 2002) (Figura 2 A).

A segunda forma é a amastigota, encontrada principalmente no ambiente intracelular do hospedeiro vertebrado, pela qual a replicação ocorre através da divisão binária. Os amastigotas possuem uma morfologia arredondada com dimensão em torno de 4  $\mu\text{m}$  e não possuem flagelo visível no microscópio óptico na porção externa. O cinetoplasto em forma de bastão encontra-se na região anterior ao núcleo (MARTINS; *et al.*, 2012) (Figura 2 B).

A terceira forma, a tripomastigota, é a infectiva, e que pode ser encontrada na porção terminal do inseto e no espaço intercelular e no sangue dos mamíferos. Os tripomastigotas apresentam cinetoplasto arredondado que se localiza na região posterior ao núcleo. Em relação ao flagelo, este emerge da porção anterior do parasito. Tripomastigotas apresentam dimensões que incluem 13  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de largura, e não são capazes de se replicarem (NAVARRO; *et al.*, 2003) (Figura 2 C).

Figura 2 Representação esquemática das três principais formas encontradas do parassito e seus característicos posicionamentos do cinetoplasto em relação ao núcleo. Adaptado de: [http://dna.kdna.ucla.edu/parasite\\_courseold/cruzi\\_files/subchapters/morphology%20and%20life%20cycle.htm](http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_courseold/cruzi_files/subchapters/morphology%20and%20life%20cycle.htm)

#### 1.4 Processo de interação parasito - célula hospedeira

Florencio-Martínez, L.; *et al.*, (2010) mostraram que os três principais estágios do *T. cruzi* (epimastigota, tripomastigota e amastigota) são capazes de infectar células não fagocíticas. Contudo, algumas diferenças no processo de infecção podem ser observadas como: (1) diferentes mecanismos moleculares para infectar a célula hospedeira; (2) tempo de detecção do parasito no interior da célula após a infecção; (3) tempo de multiplicação e (4) rompimento da célula hospedeira.

Todo o processo de infecção do *T. cruzi* pode ser dividido em seis principais etapas: (1) adesão e reconhecimento; (2) sinalização; (3) invasão; (4) escape para o citoplasma, (5) multiplicação e (6) ruptura da célula hospedeira. Embora as três formas serem invasivas e algumas mudanças entre elas acontecerem durante o processo, os eventos serão relatados de forma generalizada, visto que diferenças ocorrem quando consideramos estágio morfológico, cepa e tipo celular. Com o entendimento destes processos, foi possível reparar que o parasito se aproveita das estruturas e das rotas endocíticas já existentes na célula para infectá-la.

Como o parasito é capaz de modular os mecanismos celulares para a reparação da membrana plasmática para conseguir invadir a célula, o tropismo do parasito por cardiomiócitos e células do músculo liso pode, em parte, ser explicado pela grande capacidade destas células em reparar suas membranas (BANSAL e CAMPBELL, 2004).

### 1.4.1 Adesão e reconhecimento

As duas primeiras etapas do processo de infecção são estritamente dependentes das moléculas e receptores de superfície encontrados tanto no parasito quanto na sua célula hospedeira. Estas moléculas e receptores podem variar de acordo com a cepa, (dependendo da maior ou menor virulência) e estágio morfológico do parasito e o tipo de célula que será infectada. Estas moléculas de superfície agem como ligantes - receptores e desencadeiam a etapa da invasão seguinte (YOSHIDA e CORTEZ, 2008; ROSESTOLATO; *et al.* 2002).

A superfície do parasito é recoberta por uma camada de glicocálix, e as glicoproteínas majoritárias são o glicoinositolfosfolipídios e as mucinas que estão ancoradas à superfície através do glicosilfosfatidilinositol (PREVIATO; *et al.*, 2004). Contudo, outros tipos de moléculas também podem ser encontrados. No mais, estas glicoproteínas de superfície se ligam à componentes da matrix extracelular e/ou a receptores da célula hospedeira, ou degradam componentes da matrix, ajudam na evasão do sistema imune ou desencadeiam cascatas de sinalização bidirecionais (Fig. 3). Todas estas moléculas são tão cruciais para a sobrevivência do parasito que, aproximadamente, 50 % de todo seu genoma é responsável somente por gerá-las, e elas podem ser divididas com 4 grandes grupos: proteases gp63, superfamília da gp85/transialidases, as mucinas e as proteínas de superfície associadas às mucinas (ALVES e COLLI, 2008; EL-SAYED; *et al.*, 2005; KULKARNI, *et al.*, 2009).

Moléculas tipo mucinas: para os tripomastigotas derivados de cultura celular, as mucinas são caracterizadas por um grupo de moléculas que possuem o epítipo 3 que é específico deste estágio de vida (ANDREWS; *et al.*, 1987). A principal função das mucinas dos parasitos é servir de aceptora para o ácido siálico (SCHENKMAN; *et al.*, 1994). Várias mucinas já foram descritas como importantes no processo de invasão da célula hospedeira (VILLALTA e KIERSZENBAUM, 1984; YOSHIDA; *et al.*, 1989), embora não se saiba o mecanismo exato, acredita-se que é através da indução da liberação de cálcio no citoplasma do parasito (DORTA; *et al.*, 1995). Alguns exemplos de mucinas são as gp-82 e gp35/50, sendo a gp-82 mais eficaz em disparar cascata de liberação de cálcio e é mais encontrada em cepas muito virulentas (Fig 3- 4).

Transialidase é uma sialidase modificada que, ao invés de estar presente no Golgi como ocorre em outros Eucariotos, está na membrana do parasito. As transialidases são responsáveis por transferir ácido siálico dos sialoconjugados das células hospedeiras para as mucinas do parasito, visto que este é incapaz de sintetizá-lo (FRASCH, A. C. C., 2000) (Fig. 3- 5). A adesão deste ácido siálico pelo parasito é de grande importância visto que ele dá resistência contra o sistema complemento humano, o que é de grande relevância para o estabelecimento da infecção (TOMLINSON; *et al.*, 1994). GP 83: é uma transialidase que atua como ligante e auxilia no processo de adesão e invasão dos parasitos tanto em células fagocíticas como em não fagocíticas (LIMA e VILLATA, 1988).

Penetrina é uma proteína que auxilia na adesão e penetração da célula porque se liga a elementos da matrix extracelular tais como: heparano sulfato, heparina e colágenos tipos I e IV (ORTEGA-BARRIA e PEREIRA, 1991).

Cruzipaína é uma cisteína protease conhecida por clivar cininogênios do hospedeiro gerando cininas. Estas cininas serão reconhecidas pelo receptor de bradicinina presente na superfície do parasito, e desencadeará a liberação de cálcio no citoplasma do *T. cruzi* mediada por IP3 (SCHARFSTEIN; *et al.*, 2000) (Fig. 3- 3).

A oligopeptidase B é uma endopeptidase citosólica que é secretada pelo parasito após a indução por peptidases alcalinas sobre seus precursores. Já foi visto que a oligopeptidase B induz, indiretamente, a liberação de cálcio (através do IP3) (BURLEIGH; *et al.*, 1997). Outro tipo de oligopeptidase é a Tc 80, encontrada na superfície do parasito e que auxilia na hidrólise de fibronectinas e colágenos tipos I e IV, facilitando o trânsito do parasito pela matrix extracelular da sua célula hospedeira (GRELLIER; *et al.*, 2001) (Fig. 3- 2).

Outros fatores relacionados ao tipo celular que será infectado também influenciam na infectividade do parasito. Por exemplo, as células dendríticas e do músculo liso possuem Galectina-3, uma lectina que facilita a adesão do parasito na célula (VRAY; *et al.*, 2004; KLESHCHENKO e MOODY, 2004). As células epiteliais possuem TGF-  $\beta$  que também facilitam a entrada do parasito (Fig. 3- 1). Células neuronais e dendríticas possuem também o TrkA, que é um receptor de fator de crescimento nervoso, e neurônios e células glias apresentam o TrkC, receptor neurotrópico Tirosina Quinase C, ambos servem de receptores para os parasitos (WEINKAUF e PERRIN, 2009).

### 1.4.2 Sinalização

Após os processos anteriores, a etapa da sinalização ocorre e é resultado que uma série de ativações de cascatas desencadeadas por diferentes processos de reconhecimentos que se sobrepõem para garantirem o sucesso de invasão (Fig. 3). A etapa de sinalização consiste em estímulos bidirecionais, ou seja, ocorre um aumento da concentração de cálcio no citoplasma tanto do parasito quanto da sua célula hospedeira não fagocítica. Esta liberação de cálcio pode ser induzida por AMPs cíclicos ou mediada por IP3 e induzem uma reorganização do citoesqueleto da célula que facilitará a entrada do parasito. Quanto às células fagocíticas, a sinalização induzirá a ativação de quinases. Ambos processos auxiliarão na invasão celular (VIEIRA; CARVALHO e DE SOUZA, 1994; BARRIAS; *et al.*, 2010).

### 1.4.3 Invasão

Muitos mecanismos diferentes podem ser utilizados pelos parasitos para garantir o sucesso da invasão, e eles irão variar dependendo do tipo de célula. A invasão só ocorre depois de vários reconhecimentos entre moléculas extracelulares, proteólise da matriz extracelular e o aumento do cálcio citoplasmático. Os primeiros trabalhos envolvendo o mecanismo de entrada do *T. cruzi* (tripomastigota) em sua célula hospedeira mostraram que não ocorriam protusões na membrana plasmática e nem a formação do fagossomos, o que era uma novidade na época. O processo de invasão do *T. cruzi* diferenciava-se daquele utilizado por outros microorganismos (DVORAK e HYDE, 1973). Posteriormente, TANOWITZ; *et al.*, (1975); NOGUEIRA e COHN, (1976); DE ARAÚJO-JORGE, (1989) mostraram por microscopia eletrônica que existia uma junção entre o parasito e a membrana plasmática da célula hospedeira, sendo ela fagocítica ou não, durante o processo de invasão. Mostraram também que já no interior da célula, o parasito encontrava-se dentro de um vacúolo delimitado por membrana antes de ir para o citosol.

Em 1991, SCHENKMAN *et al.* viram que, ao contrário do que era esperado, a entrada do parasito na célula era independente da polimerização dos filamentos de actina, sendo assim, a força motora para sua internalização continuava desconhecida. Estudos de MILDER e KLOETZEL, (1980); MEIRELLES e DE SOUZA, (1983) e de DE CARVALHO e DE SOUZA, (1989)

demonstraram a ocorrência da fusão de lisossomos com vacúolos contendo parasitos após a infecção. Contudo, só em 1992, TARDIEUX e colaboradores mostraram que os lisossomos fundiam-se com a membrana plasmática da célula no local da infecção antes que esta acontecesse, que parte do vacúolo parasitóforo era constituído pela membrana de lisossomos e que os microtubulos tinham papel fundamental no transporte dos lisossomos para a membrana da célula. Em seguida, foi mostrado que o processo de exocitose dos lisossomos era dependente do aumento da concentração citoplasmática de Ca<sup>+</sup> (TARDIEUX, 1994).

Em 2003, WOOLSEY; *et al.*, propuseram uma nova via de entrada alternativa para o parasito sendo mediada pela invaginação da membrana plasmática independente de actina. Porém, uma vez no interior da célula, os parasitos necessitam dos microfilamentos de actina para se manterem no citoplasma (WOOLSEY; *et al.*, 2004). No entanto, em 2004 e 2005 ANDRADE e ANDREWS mostraram que embora existisse outra possibilidade de entrada do parasito na célula que não utilizasse os lisossomos, a fusão do parasito com estas organelas é essencial para a progressão da infecção. Os avanços nos estudos vêm detalhando outros elementos e como eles se encaixam em todo o processo de invasão e confirmam a idéia que vários deles se sobrepõem para garantir o sucesso da infecção (Figura 3). Estes estudos também possibilitam a separação dos mecanismos de entrada em dois grandes grupos (a) dependente de lisossomos e (b) dependentes de vias endocíticas.

#### 1.4.3.1 Dependente de lisossomos

Neste processo, agonistas do Ca<sup>+</sup> estimulam sua liberação através do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 é um dos produtos da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e acumula-se na célula após uma cascata de sinalização desencadeada pelo parasito na porção da membrana da célula hospedeira onde ele está aderido. O *T. cruzi* aproveita-se de um mecanismo de reparação da membrana plasmática da célula através da exocitose dos lisossomos, desencadeada pelo aumento de Ca<sup>+</sup> no citosol. Uma reorganização dos microtúbulos também causada pelo aumento do Ca<sup>+</sup> faz com que estes lisossomos se encaminhem para o local onde o parasito está penetrando na célula. A membrana destes lisossomos tanto reconstruirá a parte da membrana plasmática da célula hospedeira quanto ajudará na formação do vacúolo parasitóforo que o parasito permanecerá. Este modo de invasão acontece com menor frequência. (DE SOUZA; DE CARVALHO e BARRIAS, 2010) (Figura 3 A).

#### 1.4.3.2 Vias endocíticas

O aumento de  $\text{Ca}^{+}$  citosólico também podem induzir outros processos intracelulares que permitem a entrada do parasito tais como:

- Fagocitose: o PIP3 vai levar a uma reorganização dos filamentos de actina, auxiliando na formação de pseudópodes que captam o parasito para dentro da célula (BARRIAS; *et al.*, 2013) (Figura 3 B).

- Invaginação da membrana plasmática: a maior parte dos parasitos entra por esta via, também dependente dos filamentos de actina e mediada pelo acúmulo de IP3 na região onde o parasito adere na célula. Após 10 minutos da invasão, marcadores de endossomos primários já podiam ser visto na superfície do *T. cruzi* (WOOLSEY; *et al.*, 2003) (Figura 3 C).

Uma vez internalizado pelos diferentes mecanismos citados, o parasito permanecerá no interior do vacúolo parasitóforo por um período entre 8-16 h, onde começará seu processo de transformação para a fase amastigota, quando ocorre a ativação de vários eventos relacionados com a destruição do vacúolo onde o parasito encontra-se (<http://www.hsph.harvard.edu/barbara-burleigh/research/>). Isto sugere que o parasito é levado para a via de destruição celular cuja presença de endossomo primário, secundário e sua fusão com lisossomos, formando assim o endolisossomo, levariam a morte do parasito devido à acidificação deste vacúolo que o patógeno encontra-se. No entanto, para o *T. cruzi*, a acidificação do vacúolo em que ele se encontra é de extrema importância para a manutenção da infecção, porque o baixo pH ajudará no escape do parasito para o citoplasma da célula (ANDREWS e WHITLOW, 1989) (Figura 3- D).

#### 1.4.4 Escape para o citoplasma

Esta etapa é o resultado da desintegração da membrana do vacúolo no qual o parasito se encontra. Este processo ocorre em torno de 8 horas após a entrada do parasito na célula e se dá quando o parasito secreta transialidase e neuraminidase que removem o ácido siálico da membrana deste vacúolo tornando-a mais vulnerável a ação do Tc-Tox. O Tc-Tox é um peptídeo também secretado pelo parasito e torna-se ativo com a diminuição do pH do vacúolo (recorrente da fusão com

lisossomos da célula) e sua função é formar poros na membrana, causando a ruptura do vacúolo e a liberação dos parasitos no citoplasma da célula (ANDREWS e WHITLOW, 1989 ; LEY; *et al.*, 1990) (Figura 3 E ).

#### **1.4.5 Multiplicação no citoplasma**

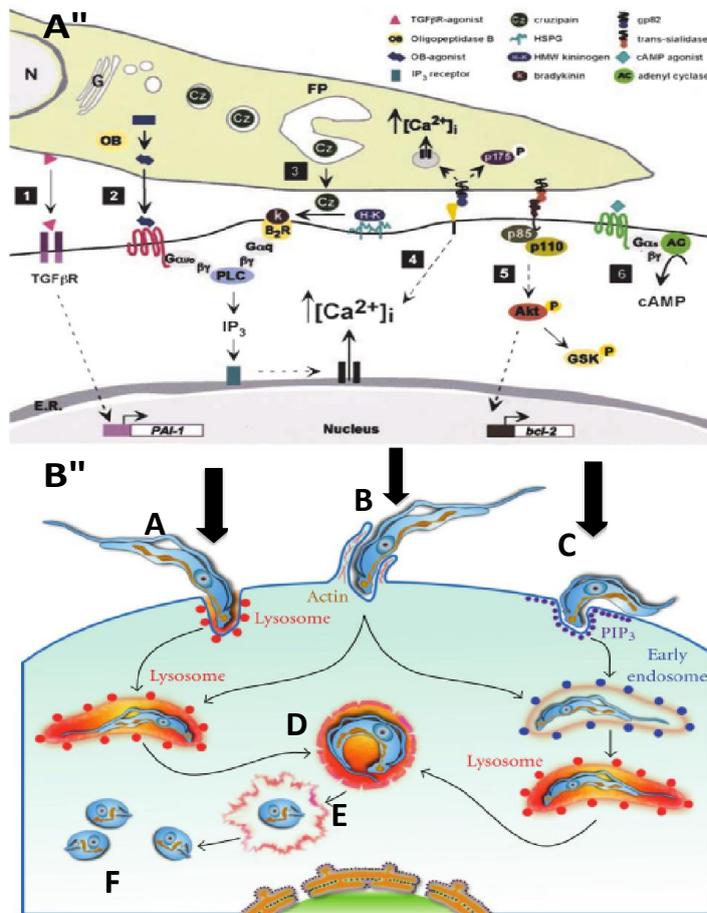
Momentos antes do parasito atingir o citoplasma da sua célula hospedeira, os primeiros mecanismos de transformação da forma tripomastigota em amastigota são disparados, e a mudança morfológica ocorrerá uma vez que o parasito entre em contato com a porção citoplasmática da célula (REFERENCIA).

Embora as etapas de transformação não sejam muito claras, sabe-se que começaram ainda no vacúolo induzido pelo baixo pH (TOMLINSON; *et al.*, 1995), e que são dependentes de fosfatases (como a sensitiva a caliculna A) (GRELLIER; *et al.*, 1999). Após um período de adaptação, os amastigotas entram em processo de multiplicação, que se mostra dependente de L-prolina (TONELLI; *et al.*, 2004) e depois de, aproximadamente, 9 ciclos de replicação, eles voltam à forma tripomastigota (ALVES e COLLI, 2007). Não se tem maiores informações sobre os eventos de multiplicação e de transformação do parasito. Embora eles sejam sincronizados para a maioria deles, os sinais que os desencadeiam não são completamente entendidos. Alguns pesquisadores acreditam que isto é uma questão genética do parasito (TEIXEIRA, 1998; TEIXEIRA e DAROCHA, 2003) (Figura 3 F).

#### **1.4.6 Ruptura da célula hospedeira**

**Figura 3** Esquemas representativos dos mecanismos envolvidos no processo de invasão do tripomastigoto do *Trypanosoma cruzi* e do ciclo intracelular do parasito. (A) Mecanismos envolvidos na sinalização bidirecional para a liberação do cálcio no citoplasma da célula hospedeira e do parasito e na garantia da sobrevivência desta célula

A



(TGF-β, ao ser reconhecido pelo seu receptor produz genes (PAI-1) que inibem a ativação do plasminogênio e a GP 85, que induz a expressão do gene bcl-2, conhecido por ser um anti-apoptótico). (B) Representa os principais meios de entrada do parasito na célula e os fatores que permitem sua sobrevivência e multiplicação (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002; DE SOUZA; CARVALHO e BARRIAS, 2010).

### 1.5 Aspectos da morfologia e ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*

Além de apresentar todas as estruturas presentes nas células eucarióticas convencionais, o *Trypanosoma cruzi* também possui certas estruturas especializadas como: o cinetoplasto, o acidocalcissoma, o citóstomo, o reservossomo e os microtúbulos subpeliculares. Estruturas estas que podem sofrer alterações de acordo com o estágio morfológico em que o parasito apresenta.

A superfície celular dos tripanossomatídeos é composta pelo glicocálix, a bicamada lipídica e os microtúbulos subpeliculares, todos em diferentes quantidades dando maior ou menor fluidez a membrana plasmática. Entre as moléculas de superfície, podem ser vistas: mucinas, transialidades, glicoproteínas, entre outras que estão em domínios e quantidade específicas de acordo com a forma

morfológica em que o parasite se encontra (DE SOUZA, 2009). A membrana plasmática do parasito não é homogênea quanto a sua densidade e distribuição de componentes, e isto é demonstrado pelos seus macrodomínios: corpo celular, bolsa flagelar e flagelo e microdomínios: o citóstomo, a base do flagelo e o local onde o flagelo adere-se ao corpo do parasito na forma tripomastigota (MARTINEZ-PALOMO; DE SOUZA e GONZALES-ROBLES, 1976; DE SOUZA, 2009).

O citoesqueleto dos tripanosomatídeos é bastante característico pela presença dos microtúbulos subpelliculares, que são assim chamados por se encontrarem abaixo de toda membrana plasmática do parasito, exceto na região do flagelo, conferindo a ela alta resistência. Os microtúbulos têm arranjos helicoidais e são capazes de manter uma distância específica entre eles, e entre eles e a porção interna da membrana plasmática, contudo alguns pontos de conexões entre eles são vistos (DE SOUZA, 2009). Quanto a actina, embora embora já tenha sido caracterizada em *T. cruzi*, seus filamentos assim como microfilamentos ainda não foram observados (DE MELO; *et al.*, 2008).

O citóstomo é uma região encontrada nos microorganismos do sub-gênero *Schizotrypanum* nas formas epimastigotas ou amastigotas. O citóstomo origina-se de uma porção especializada da membrana plasmática que invagina-se, passa pelo núcleo e alcança a bolsa flagelar e a função desta região é a internalização de macromoléculas pelo parasito (DE SOUZA, 2002).

Os reservossomos são organelas caracterizadas como pré-lisossomais e conhecidas por estocarem macromoléculas internalizadas pelo citóstomo. Estas moléculas serão utilizadas a medida que os nutrientes tornam-se escassos ou em processos de transformação como da forma epimastigota para a tripomastigota (SOARES; *et al.*, 1989).

O flagelo tem a função não só de locomover o parasito como também de aderir nos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Este emerge de uma area de invaginação da membrana plasmática chamada de bolsa flagelar. É formado por um conjunto de 9 pares de microtúbulos periféricos e 2 pares de microtúbulos centrais circundados por uma membrana, e seu comprimento varia de acordo com a morfologia do parasito (DE SOUZA, 2002).

Os tripanosomatídeos possuem o complexo mitocôndria–cinetoplasto, que consiste em mitocôndria única, mas altamente ramificada, e o cinetoplasto, que é uma estrutura característica dos microorganismos da ordem dos Cinetoplastídeos. O cinetoplasto é uma porção do DNA mitocondrial em torno de anéis concatenados em maxicírculos ou minicírculos. A morfologia do cinetoplasto assim

como sua localização diferenciam-se dependendo do estágio morfológico em que o parasito se encontra (RIOU e YOT, 1977). Nas formas epimastigotas e amastigotas, o cinetoplasto é bastante compactado na forma de bastão, enquanto nos tripomastigotas, o cinetoplasto é arredondado e o DNA encontra-se mais disperso (SOUTO-PADRÓN e DE SOUZA, 1978).

Os glicossomos são organelas esféricas com uma matrix homogênea presentes no citoplasma do *T. cruzi*. Estruturas similares com presença de catalases e oxidases (responsáveis pela degradação de peróxido de hidrogênio) são encontradas em mamíferos e, por isso, recebem o nome de peroxissomos (OPPERDOES e BORST, 1977). Enquanto que as vias glicolíticas e metabólicas como metabolismo de peróxidos,  $\beta$ - oxidação de ácidos graxos, síntese de fosfolipídios de outras células ocorrem no citoplasma, nos tripanosomatídeos elas estão restritas aos glicossomos (DE SOUZA, 2009). Também nos glicossomos ocorrem a fixação de dióxido de carbono (OPPERDOES e COTTON, 1982), reciclagem de purina e biossíntese *de novo* de pirimidina, alongamento de ácido graxo, biossíntese de isoprenóides e esteróis (OPPERDOES, 1987).

O acidocalcissoma é uma estrutura circular semelhante a um vacúolo presente em Tripanosomatídeos, com um material eletrondenso na sua periferia (VERCESI; MORENO e DOCAMPO, 1994). Primeiramente, a estrutura foi descrita como vesícula de inclusão e só em 1995 foi mostrado que nestas organelas havia uma alta concentração de cálcio (DOCAMPO, 1995). Estudos citoquímicos mostraram a presença de  $H^+$  ATP-ase,  $Ca^{2+}$  ATPase e pirofosfatase na membrana do acidocalcissoma. A quantidade destas organelas varia de acordo com o estágio do parasito, estando mais presentes nas amastigotas em comparação com epimastigotas e tripomastigotas (BENCHIMOL e DE SOUZA, 1998; SCOTT; *et al.*, 1998). Os íons que estão contidos nestes acidocalcissomos também já foram descritos e podem ser encontrados além do cálcio: sódio, potássio, zinco e ferro (MIRANDA; *et al.*, , 2004). Entre as funções descritas destes acidocalcissomos estão: estocagem de íons e compostos fosfatados tais como pirofosfatos e polifosfatos, manutenção do pH e osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 2005).

## 1.6 Mecanismos de sobrevivência do parasito

O estilo de vida dos parasitos intracelulares é relativamente raro, o que indica a dificuldade de ser sustentado. Dentre os desafios enfrentados estão: sobreviver a diversos microambientes, conseguir entrar na célula, evadir de seus mecanismos microbicidas, adquirir os nutrientes

necessários e manter um fino equilíbrio entre o estabelecimento da infecção e a vida do seu hospedeiro (SIBLEY, 2011).

Para sobreviver aos diversos microambientes por onde passa durante seu ciclo de vida, o parasito precisa se adaptar às diversas condições que lhe são impostas. Para isto, eles sofrem modificações morfológicas e bioquímicas que permitem o seu sucesso (VICKERMAN, 1985). As principais mudanças bioquímicas ocorrem nas moléculas de superfície do parasito, as quais muitas delas são conhecidas como fatores de virulência. Estes fatores de virulência podem ser considerados coadjuvantes que facilitam a evasão do sistema imune, a entrada do parasito na célula, o estabelecimento da infecção, a proliferação, o desenvolvimento da doença no hospedeiro e o egresso das células infectadas (BROWN; *et al.*, 2012). Atualmente, algumas enzimas antioxidantes do parasito que atuam na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas durante o contanto com a célula hospedeira também têm sido consideradas fatores de virulência (PIENZA; *et al.*, 2009) As expressões destes fatores de virulência agem em sequência e estão relacionadas ao estágio do ciclo o qual o parasito se encontra e se ele está no seu hospedeiro invertebrado ou vertebrado (EPTIN; *et al.*, 2010). Provavelmente é a heterogeneidade entre estes fatores de virulência que ditam a patogenia de diferentes cepas de *T. cruzi* e os danos causados no hospedeiro vertebrado (BRISSE; *et al.*, 1998). Sendo assim, a perda destes fatores implica na perda de virulência do parasito, mas não da sua viabilidade propriamente dita (BROWN; *et al.*, 2012).

Dentre os fatores de virulência, existem vários cujas funções é tornar o parasito resistente ao sistema imunológico de seu hospedeiro. Podem ser citadas as glicoproteínas gp160 (NORIS; *et al.*, 1991) T-DAF (trypomastigote decay accelerating factor) (TAMBOURGI; *et al.*, 1993), Tc-CRT (calreticulina) (VALCK; *et al.*, 2010) que dificultam a ativação do sistema complemento ao se ligarem aos seus componentes impedindo a formação das C convertases, e a mudança no padrão das mucinas, que atrapalha a montagem de uma resposta imune contra o parasito (BUSCAGLIA; *et al.*, 2006). Outros fatores de virulência como a gp 82, gp35/50, gp 85, fosfolipase A estão envolvidos no processo de adesão e invasão da célula hospedeira. Há também a fosfatidilinositol fosfolipase C e a proteína fosfatase 2 A que estimulam a diferenciação e proliferação celular (MARTINS; *et al.*, 2010 ; MORO; *et al.*, 1995).

Embora no ambiente intracelular os parasitos estejam protegidos da resposta imune humoral, as células hospedeiras desenvolveram mecanismos microbicidas de eliminação ou controle da infecção para evitar a sua morte. Sendo assim, o parasito tem a necessidade de burlar uma série de vias de proteção celular como: indução de apoptose, da via autofágica, e da imunidade mediada por

GTPases, produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (radical superóxido, peróxido de hidrogênio), vias de degradação lisossomais, além de evitar o reconhecimento por receptores (SIBLEY, 2011). No entanto, os dois mecanismos microbicidas são aqueles relacionados com a fagocitose e a autofagia.

A fagocitose é um processo da resposta imune inata desencadeado pelo contato com um patógeno e varia de acordo com a partícula que está sendo internalizada. A fagocitose uma vez iniciada origina uma série de respostas celulares como: reorganização do citoesqueleto, mudanças no tráfego de vesículas membranares, ativação de mecanismos antimicrobianos, indução de citocinas e quimiocinas pro e antiinflamatórias, ativação da apoptose e a síntese de moléculas necessárias na apresentação antigênica para o sistema imune adaptativo (UNDERHILL e OZINSKY, 2002).

O processo de autofagia é responsável por controlar a qualidade e a quantidade dos constituintes das células eucarióticas, controlando a reciclagem de proteínas e organelas não funcionais. Este processo é estimulado através da ausência de nutrientes, de situações de estresse oxidativo e de má formação proteica (MEIJER e CODOGNO, 2004). Recentemente, a autofagia foi relacionada ao controle de microorganismos intracelulares e é capaz de eliminá-los por um processo subdenominado xenofagia, já que ajuda na seleção de células T CD4 e homeostase das células T e B através da apresentação de antígenos pelo MHC classe II (DERETIC e LEVINE, 2009). A autofagia é caracterizada pela formação de um fagóforo e, posteriormente, do autofagossomo. Ambas as organelas são circundadas por uma membrana específica com características também presentes na membrana do retículo endoplasmático (SEGLÉN e BOHEY, 1992). Uma vez que este autofagossomo se funde com outros componentes da via endocítica e com lisossomos forma-se o autofagolisossomo, onde a partícula fagocitada é digerida (ROMANO; *et al.*, 2009). Apesar de a autofagia ser um mecanismo do sistema imunológico contra patógenos, muitas vezes estes se aproveitam do processo para facilitar a infecção através da modulação da autofagia em seu favor (ROMANO; *et al.*, 2007).

### 1.7 Quimioterapia para doença de Chagas

Mesmo com muitos estudos envolvendo diversas classes de drogas sintéticas quanto compostos naturais com atividade contra o *T. cruzi*, nenhum tratamento novo e completamente efetivo foi proposto mesmo após mais de cem anos da descoberta da doença. O fato de a doença ser

causada por um parasito intracelular e muitos dos seus mecanismos biológicos também sejam compartilhados por suas células hospedeiras, há uma dificuldade no desenvolvimento de quimioterápicos que minimizem os danos às células. Desde a década de 60 compostos da classe semicarbazona (nitrofurazona) já apresentavam efeitos de diminuição da parasitemia em camundongos infectados, contudo induziam sérios efeitos colaterais (BRENER, 1961). No entanto, os estudos com compostos contendo o grupamento nitro-heterocíclico continuaram, o que levou a descoberta do nifurtimox e do benzonidazol nos anos 1960 e 1970, respectivamente (Figura 4). Apesar de serem eficazes somente para tratar a fase aguda da infecção, estes dois medicamentos continuam sendo as duas únicas opções para tratar a doença (COURA e DE CASTRO, 2002). As razões pelas quais ambos os medicamentos não possuem uma atividade satisfatória durante a fase crônica não são muito esclarecidas. Entre as possibilidades estão atividades farmacocinéticas desfavoráveis que limitam a meia-vida da droga no organismo e sua penetração nos tecidos onde se encontram os parasitos (URBINA e DOCAMPO, 2003). Tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox causam vários efeitos colaterais ao paciente que estão relacionados com a idade do indivíduo, a região demográfica e o tratamento que recebe. Dentre os danos causados podem ser citados: anorexia, náusea, perda de peso, dermatopatia alérgica, depressão na medula óssea, trombocitopenia púrpura e agranulose, polineuropatia e polineurite dos nervos periféricos, os quais podem levar a interrupção do tratamento (RASSI JR; *et al.*, 2010). Também já vem sendo relatado casos de resistência do parasito ao tratamento. DOCAMPO (1990) viu que o mecanismo de ação das drogas está relacionado com a biorredução de grupamentos nitro. A ação do nifurtimox é devido ao estresse oxidativo, como consequência da alta produção de espécies reativas de oxigênio (MAYA; *et al.*, 2007), enquanto o mecanismo do benzonidazol é através de formação de interações de intermediários nitroredução com componentes do parasito (POLAK e RICHLE., 1978), ou ligação com DNA, lipídeos e proteínas (TORANZO; *et al.*, 1988).

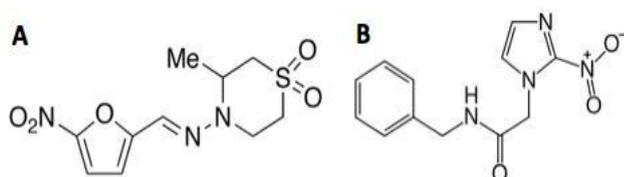


Figura 4 Representação da estrutura molecular das duas atuais drogas usadas no tratamento da tripanosomíase Americana. (a) Estrutura molecular do Nifurtimox e (B) do Benznidazol.

Devido aos fatos citados acima, há uma grande necessidade de novas drogas mais específicas para o protozoário e mais eficiente durante a fase crônica da doença. Neste cenário, o estudo sobre os aspectos biológicos e bioquímicos do parasito, assim como sobre suas organelas e estruturas, principalmente as que diferem dos mamíferos, são de grande importância para o desenvolvimento de novos tratamentos. A busca de novas alternativas para o tratamento tem levado em consideração alvos específicos do parasito que são essenciais para sua sobrevivência e proliferação. Vários destes alvos já vêm sendo descritos como:

- A) Biossíntese de ergosterol, já que alguns esteróis específicos são necessários para a viabilidade celular e proliferação do parasito em todos os seus estágios de vida, por isto sua via de biossíntese é um possível alvo a drogas (URBINA, 2002). Já foram demonstrados alguns compostos derivados do triazol mostraram atividade bastante satisfatória em camundongos em fase aguda e crônica da doença (URBINA; *et al.*, 1996; URBINA e DOCAMPO, 2003).
- B) Cisteína protease (cruzipaina), que é responsável pelas atividades proteolíticas em todos os estágios do *T. cruzi*. HERNANDEZ e ROUSH, (2002) mostraram que quando compostos inibidores de cisteína protease atuam, eles bloqueiam esta enzima, impedindo a proliferação do parasito em todas as suas formas, aumentando o tempo de vida de camundongos na fase aguda da infecção.
- C) Trans-sialidases, que são enzimas com papel de transferir ácido siálico de glicoconjugados de mamíferos para resíduos de mucina presentes na membrana do parasito. A importância deste ácido siálico consiste em evitar o reconhecimento do *T. cruzi* pelo sistema imune do hospedeiro, e como estes parasitos não são capazes de sintetizar *de novo* este ácido, as trans-sialidases possuem um papel fundamental em garantir a permanência no hospedeiro. Já foi visto que compostos inibidores da trans-sialidase podem agir de duas formas: (1) ou fazem mimetismo com o ácido siálico (2) ou mimetizam aceptores/doadores dele (NERES; *et al.*, 2008).
- D) Transportador ABC, visto que proteínas presentes nestes transportadores são responsáveis pela translocação do grupamento heme através da membrana plasmática dos parasitos (CUPELLO; *et al.*, 2011). O uso de ciclosporina A, um inibidor das proteínas

dos transportadores mostram a diminuição do influxo do grupamento heme e, como consequência, diminuição da replicação de epimastigotas, da internalização de tripomastigota e parasitemia *in vivo* (BÚA; *et al.*, 2008).

- E) Enzimas responsáveis pelo ciclo celular dos tripanossomatídeos, nas quais existem diferenças funcionais e estruturais daquelas das células de mamíferos que podem ser exploradas como alvos. Entre estas enzimas estão aquelas responsáveis pelo controle do ciclo e vias de transdução de sinais (HAMMARTON; *et al.*, 2003).

### 1.8 Ribonucleotídeo Redutase (RNR)

Baseando-se nas diferenças das enzimas atuantes no ciclo celular, principalmente a Ribonucleotídeo Redutase (RNR), que os primeiros estudos do nosso laboratório foram realizados, utilizando três classes de drogas: (1) as semicarbazonas; (2) tiosemicarbazonas e (3) tiazolidinonas, sendo a 2 e a 3 derivadas da primeira.

A RNR é responsável pela síntese *de novo* de DNA através da substituição do grupo 2`OH da cadeia de RNA por um H, originando uma nova fita de DNA. Estruturalmente a RNR está dividida em porção R1 e R2 e é na porção R2 que encontram-se dois átomos de ferro e um radical tirosila, ambos fundamentais para a funcionalidade enzimática e, por causa disso, são alvos prioritários (Fig. 5).

Embora também presente nas células hospedeiras, a RNR deste protozoário é um possível alvo de drogas porque diferenças na sequência de aminoácidos as tornam um pouco diferentes estruturalmente, fazendo com que a RNR do parasito seja a prioridade dos compostos. (MUNRO e SILVA, 2012).

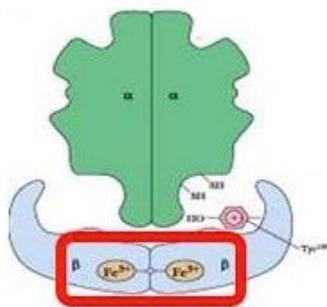


Figura 5 Esquema da estrutura da enzima Ribonucleotídeo Redutase com suas duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Na subunidade  $\beta$  que se encontram os dois átomos de Ferro essenciais para a atividade enzimática. Em destaque, os dois átomos

de Ferro que são os alvos.

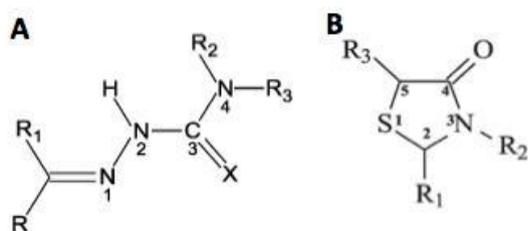
### 1.9 Semicarbazonas, Tiosemicarbazonas e 4-Tiazolidinonas

Estas três classes de drogas (Fig. 6) foram escolhidas por agirem prioritariamente como quelante de metais, o que faz com que elas exerçam atividade inibitória, preferencialmente, contra enzimas metálicas, com grande preferência pela Ribonucleotídeo Redutase (RNR). A atividade inibitória é devido à desestabilização ou danos nos radicais livres tirosil da subunidade  $\beta$  que ficam estabilizados devido ao átomo de ferro. Uma vez este ferro é bloqueado pela droga, a atividade da RNR é inibida (ZHENG; *et al.*, 2001)

A propriedade quelante de metais destas classes de drogas vem sendo bastante explorada contra uma grande variedade de patógenos incluindo: células cancerígenas (REIS; *et al.*, 2010), vírus (PELOSI, 2010), (KUÇUKGUZEL; *et al.*, 2006) fungos, bactérias (VICINI, 2006), e protozoários (CARVALHO; *et al.*, 2010; GREENNAUM; *et al.*, 2004).

O primeiro composto testado foi a Hidroxiuréia (HU) uma droga antineoplásica pertencente a classe semicarbazona e conhecida por inibir o ciclo celular na fase G1/S, impedindo a atividade da RNR e a síntese de DNA (MELO *et al.*, 2000; MELO e BEIRAL, 2003).

Os demais análogos desta e das outras classes foram sintetizados mantendo a estrutura central da molécula e alterando os radicais. Por ter uma síntese relativamente simples e uma grande versatilidade, vários análogos têm sido sintetizados e testados e pode-se observar que qualquer modificação feita na estrutura da droga influencia fortemente sua atividade (VERNA e SARAF, 2008).



(X = S) e (B) 4-Tiazolidinona.

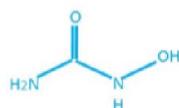
Figura 6 Representação esquemática das duas classes de drogas. (A) Semicarbazona (X = O) ou Tiosemicarbazona

## 2.0 Histórico dos testes utilizando as Semicarbazonas, Tiosemicarbazonas e 4-Tiazolidinonas

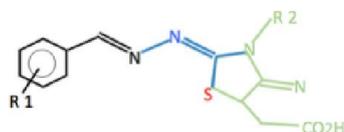
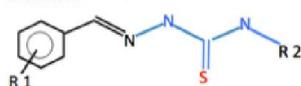
Os primeiros estudos feitos pelo grupo testaram a Hidroxiuréia (HU), uma semicarbazona (MELO; *et al.*, 2000). MELO e BEIRAL (2003) mostraram os efeitos da droga contra os parasitos *T. gondii*, *Leishmania amazonensis* e *Trypanossoma cruzi*. Em 2005, TENÓRIO *et al.*, se basearam na estrutura da Hidroxiuréia e sintetizaram tiosemicarbazonas a partir de benzaldeídos, além dos seus derivados tiazolidínicos e semicarbazonas e testaram suas atividades anti- *Toxoplasma gondii*. Baseando-se nesta síntese, AQUINO e colaboradores (2008), produziram os benzaldeídos-4-fenil-3-tiosemicarbazonas com diferenças no R1 e R2 que foi substituído por um grupamento fenil e testaram suas atividades antimicrobiana e anti-*T. gondii*. Em 2010, o trabalho do grupo sobre síntese de drogas foi para analisar a ação de análogos das tiosemicarbazonas e seus derivados tiazolidínicos sobre a multiplicação e processo de destruição de *T. gondii* (CARVALHO *et al.*, 2010). Também em 2010, LIESEN; e colaboradores, testaram a atividade de análogos de aciltiosemicarbazidas e tiazolidinonas contra protozoário (*T. gondii*), bactérias (*E. coli* e *M. smegmatis*) e fungos (*Candida* sp. e *A. niger*). Por fim, em 2013, Marco Antônio e colaboradores (GOMES; *et al.*, 2013) testaram uma nova série de fenilsemicarbazonas e feniltiosemicarbazonas contra *T. gondii* (Figura 7 e Tabela 1).

No presente trabalho foram utilizadas 7 tiosemicarbazonas e 7 tiazolidinonas cujas estruturas estão esquematizadas na Figura 8.

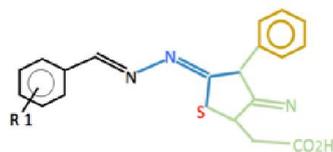
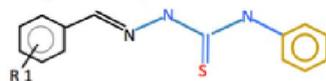
Melo et al., 2000 e Melo e Beiral, 2003.



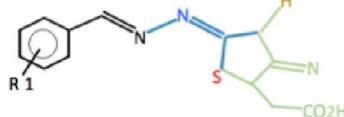
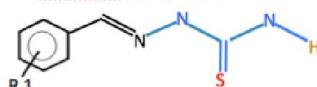
Tenório et al., 2005



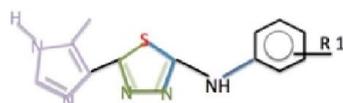
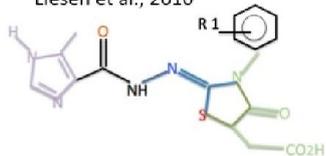
Aquino et al., 2008



Carvalho et al., 2010



Liesen et al., 2010



Gomes et al., 2013

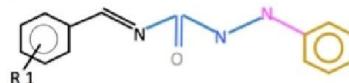
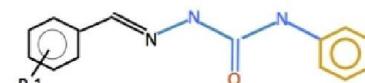
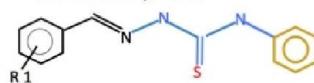


Figura 7 Esquema das estruturas moleculares dos compostos usados nos outros testes do grupo.

Tabela 1 Lista dos radicais utilizados nos compostos testados pelo grupo e suas respectivas atividades antimicrobianas.

<b>Autores e ano</b>	<b>Radicais</b>	<b>Atividades</b>
Melo et al., 2000	Nenhum	<i>Toxoplasma gondii</i>
Melo and Beiral 2003	Nenhum	<i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Tenório et al., 2005	R 1: o-NO <sub>2</sub> m-NO <sub>2</sub> p-NO <sub>2</sub> R 2: H; CH <sub>3</sub> C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> ; CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Aquino et al., 2008	R 1: H; 2-F; 3-Cl; 4-Cl; 2,4-Cl; 3,4-Cl; 3-CH <sub>3</sub> ; 4-CH <sub>3</sub> ; 3-OCH <sub>3</sub> ; 2,4-OCH <sub>3</sub> ; 4-OH; 3-OCH <sub>3</sub> ; 4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 3,5-BIS-(1,1-dimetiletil)	<i>Toxoplasma gondii</i> e antibacteriana
Carvalho et al., 2010	R 1: H; Cl; NO <sub>2</sub>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Liesen et al., 2010	R 1: H; OCH <sub>3</sub> ; Cl; F	<i>Toxoplasma gondii</i> e antibacteriana
Gomes et al., 2013	R 2,6-dimetoxi-4-hidroxi; 2,3,4-trihidroxi; 2,4,5-trihidroxi	<i>Toxoplasma gondii</i>

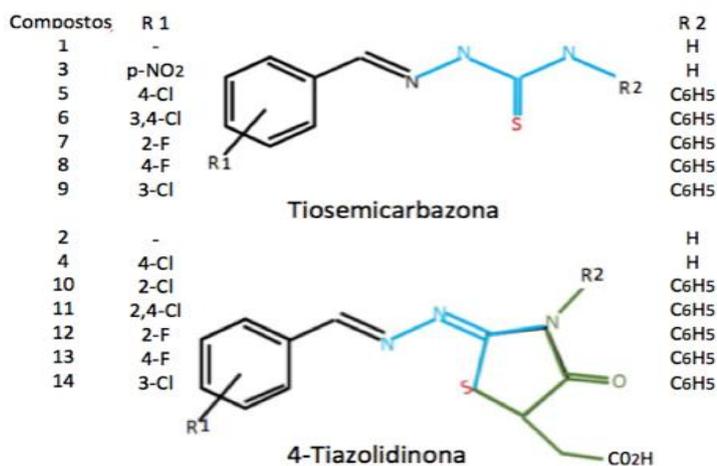


Figura 8 Esquema das estruturas dos compostos utilizados no presente estudo e seus respectivos radicais.

## 2 Relevância do trabalho

A tripanossomíase é uma doença endêmica em 21 países da América Central e do Sul, contudo, já tiveram relatos de casos em países como Estados Unidos, Canadá e em muitos países da Europa. A WHO estima que existem em torno de 8 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* ao redor do mundo. Isto tem um custo econômico muito grande para um país que chega a gastar na ordem de U\$ 260 milhões só com tratamento para os pacientes e há perda de mão de obra trabalhadora também (WHO, 2014).

Em vista destes fatos, há uma grande necessidade de tratamentos efetivos e sem os efeitos tóxicos causados pelas atuais drogas utilizadas. Por isto, há uma grande importância de se testar a atividade anti-parasitária de novos compostos, assim como de se entender um pouco sobre os acontecimentos de ambos as células hospedeira e do parasito na presença destas novas drogas. Os entendimentos sobre a ação da droga e do comportamento do parasito são de extrema importância no processo de estudo de um possível novo medicamento

### **3 Objetivos**

#### **Geral:**

Testar a citotoxicidade *in vitro* de sete compostos pertencentes a classe Tiosemicarbazona e sete derivados pertencentes a classe 4-Tiazolidinona sobre células de mamífero (Vero) e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

#### **Específicos:**

1. Determinar qual o composto e qual concentração é mais eficiente em reduzir a infecção e número de parasitos sem causar danos às células hospedeiras para prosseguir com os experimentos.
2. Analisar o progresso da infecção/tratamento utilizando o composto mais eficiente em uma concentração determinada, variando o tempo de tratamento (12, 24 e 36 horas) e comparando seus resultados;
3. Observar se, após 24 horas de tratamento com o composto, os parasitos ainda restantes na cultura sofreram efeitos reversíveis ou irreversíveis e
4. Verificar a ocorrência de mecanismos celulares que estão eliminando o parasito da cultura de células.

## 4 Metodologia

### 4.1 Células hospedeiras

Células Vero (fibroblasto de rim de macaco verde africano) foram cultivadas em garrafas plásticas (25 cm<sup>2</sup>) contendo meio DMEM 1152 (Dulbecco's modify Eagle medium - Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) em estufa a 37 °C, a 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura foi mantida até as células atingirem uma densidade que cobria a garrafa, mas sem se sobreporem (monocamada). Uma fração destas células foi solta do substrato pela ação da tripsina e foi colocada em novas garrafas para manutenção ou em placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis (na proporção de 4x10<sup>3</sup> células) para o início dos tratamentos.

### 4.2 Cultivo do *Trypanosoma cruzi* (cepa DM28)

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram colocados na centrifuga clínica a 1000 g por 10 minutos. O concentrado formado foi suspenso em 1 mL do meio de cultivo DMEM. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer. Após a contagem do número de parasitos e de células, a cultura hospedeira foi infectada em uma proporção de 20 parasitos por célula. A cultura foi mantida em estufa a 37° C. Depois de 6-7 dias, os parasitos romperam as células e foram liberados no meio. Logo eles foram recolhidos e usados em uma nova infecção.

### 4.3 Compostos sintéticos

Todos os compostos sintéticos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO - MERCK) (1.5% v/v) e meio DMEM, onde a concentração de DMSO usada não é tóxica para os parasitos ou as células hospedeiras. Primeiramente, o meio com o composto e o DMSO foram filtrados através de membranas de 0.22 µm e a solução estoque preparada. Em seguida, as seguintes concentrações de uso foram feitas: 0,1; 1; 5 e 10 mM.

Todos os compostos testados foram cedidos pelo Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI – UENF).

Como drogas de referências foram usadas a Hidroxiuréia e o Benzonidazol nas mesmas concentrações.

#### 4.4 Tratamentos das células e parasitos

As placas de 24 poços contendo as células foram mantidas em estufa a 37° C por 24 h. A interação de 10 parasitos por célula foi realizada. Depois de 24 horas, as células foram incubadas com os compostos dissolvidos em um novo meio por mais 24 horas.

##### **4.4.1 Teste de reversibilidade:**

Após os resultados obtidos com a incubação de todos os compostos, o composto 1 na concentração de 1 mM foi escolhido como tendo os melhores resultados em relação à diminuição de células infectadas e números de parasitas e respeitando o DL 50.

Após 24 horas de incubação, o meio contendo a droga foi retirado e substituído por outro só contendo o soro fetal bovino por mais 24 horas. Após este tempo, as lamínulas foram processadas para microscopia óptica.

#### 4.5 Microscopia óptica:

##### **4.5.1 Análises quantitativas e morfológicas:**

As lamínulas contendo as células foram lavadas por três vezes com PBS, fixadas com formaldeído 4 % por 10 minutos, coradas com solução de Giemsa (1:9 de PBS) por 6 horas em temperatura ambiente, desidratadas em solução de acetona-xilol e montadas em lâminas

histológicas. Ao final, as lâminas foram observadas no microscópio óptico, e quantificadas quanto ao número de células infectadas, células não infectadas e número de parasitos intracelulares.

#### 4.5.2 Ensaio com fluorescência para observação de organelas e fenômenos celulares

##### 4.5.2.1. Avaliação da acidificação vacuolar:

- **Laranja de acridina (LA) (Sigma Chemical Co.):** as culturas controles e tratadas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com 5 g/mL de LA diluído em meio DMEM 1152 com 5% de SFB (KIELIAN and COHN, 1980). O filtro de excitação utilizado foi o 492 nm e o de emissão, 540 nm.

- **Lyso-tracker Red (Mol. Probes) (marcador específico de lisossomos):** foi utilizado em uma concentração de 50 nM dissolvido em meio DMEM 1152. As culturas foram incubadas com o marcador por 30 minutos, a 37°C, que foi visualizado no filtro excitação de 577 nm e emissão, 592 nm.

##### 4.5.2.2 Detecção de vacúolos autofágicos:

- **Monodansilcadaverina (MDC) (Sigma Aldrich®):** é um marcador específico para vacúolos autofágicos. Para a marcação, as culturas foram incubadas com 0,05 mM MDC em PBS por 10 min. Os resultados foram vistos em um microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan usando o filtro de excitação 335 nm, e de emissão, 512 nm de acordo com BIEDERBICK; *et al*, 1995.

Todos os ensaios de fluorescência foram feitos utilizando o microscópio Zeiss Axioplan, equipado com luz tipo LED, câmera Olympus DP72, lente de 63x.

#### 4.6. Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão:

As garrafas de cultura de células Vero foram lavadas com PBS a 37 °C e fixadas a temperatura ambiente em solução contendo 1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 5 mM de cloreto de cálcio e 5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora. As células foram pós-fixadas em solução contendo 2% de tetróxido de ósmio (Sigma), 0,8% de ferrocianeto de potássio (Sigma), 5 mM de cloreto de cálcio, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora. Logo, as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 3 vezes e após, desidratadas em sequência crescente de acetona (50, 70, 90, 100, 100 %), por dez minutos cada. Então, as amostras foram incluídas em resina PolyBed (Sigma) na proporção de 1:1 acetona - resina por 6 horas, 2:1 resina – acetona durante 6 horas, resina pura no período 12 h, que foi trocada por outra resina para a polimerização em estufa a 60° C por 48 horas. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo (Reicherst Ultracut – Leica) e coletados em grades de cobre. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila por 20 minutos e, posteriormente, por citrato de chumbo durante 5 minutos, ambos no escuro. Após 24 horas de secagem, os cortes foram visualizados com um microscópio eletrônico de transmissão ZEISS 900 a uma voltagem de 80 kV.

## 5 Resultados

Após 48 h de infecção das células Vero com tripomastigotas de *T. cruzi*, amastigotas intracelulares em proliferação foram observados, indicando o estabelecimento da infecção. Então, as culturas infectadas foram incubadas com os compostos (TSC e 4-Tiazolidinona) nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 mM durante 24 horas. Depois dos tratamentos, análises morfológicas e quantitativas foram feitas para observar o efeito das novas drogas sobre a sobrevivência das células hospedeiras e parasitos.

### 5.1 Análises quantitativa e estrutural

A contagem dos campos das lamínulas mostrou que todos os compostos causaram uma diminuição na infecção através da eliminação dos parasitos. Este efeito foi observado desde o tratamento de 0,1 mM para todos os compostos e foi progressivo até a concentração de 5 mM. A concentração de 10 mM foi extremamente tóxica para o parasito e para célula eliminando toda a cultura (tabela 2). Analisando tanto o resultado da redução da porcentagem de células infectadas quanto da diminuição dos parasitos, pode-se observar apenas pequenas diferenças entre as duas classes de drogas. Por fim, o composto 1, uma TSC, foi escolhido devido sua grande eficiência em eliminar os parasitos da cultura em baixas concentrações sem causar danos tóxicos às células hospedeiras para dar continuidade aos testes.

Tabela 2 Cultura de células Vero infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* por 48 h e tratadas com os compostos de 1-14, as drogas de referência e as diferentes concentrações.

Foram observados os efeitos dos compostos sobre a infecção e a multiplicação de parasitos intracelulares. TOX= tóxico (não restaram células).

composto	Porcentagem de células infectadas após 24 h de tratamento					Número de parasitas intracelulares				
	Controle	0,1 mM	1 mM	5 mM	10 mM	controle	0,1	1	5	10
1	84±12	69±6	37±5	11±5	TOX	1428±21	1104±32	437±30	530±23	TOX
2	60±6	62±4	46±7	13±5	TOX	999±22	785±124	886±34	560±17	TOX
3	22±1	14±2	6±1	5±2	TOX	335±13	221±21	67±7	55±14	TOX
4	67±3	71±5	46±4	12±4	TOX	944±84	846±75	436±91	220±35	TOX
5	30±1	25±1	15±1	12±1	TOX	981±51	811±19	580±38	215±19	TOX
6	30±2	25±1	20±1	14±1	TOX	655±28	580±13	422±16	333±13	TOX
7	31±1	26±1	20±1,5	16±1	TOX	844±20	577±15	298±16	214±8	TOX
8	41±3	29±3	19±2	12±2	TOX	900±45	621±31	259±12	133±9	TOX
9	32±1	26±1	20±1,5	16±1	TOX	894±20	597±17	279±16	224±8	TOX
10	34±2	27±1	24±2	TOX	TOX	730±48	586±24	481±45	TOX	TOX
11	40±3	29±3	19±2	12±2	TOX	900±45	620±81	259±11	133±9	TOX
12	31±1	23±1	18±2	17±1	TOX	690±34	477±35	257±18	222±7	TOX
13	81±1	59±8	20	22	TOX	830±58	785±48	316±25	102±20	TOX
14	81±8	59±6	18	TOX	TOX	840±56	774±60	337±28	TOX	TOX
BZN	39±1	32±1	22±1	13±5	TOX	980±39	762±38	487±48	257±11	TOX
HU	88±1	84±1	76±2	14±2	TOX	1265±13	959±18	759±22	173±39	TOX

Outro fator que também influenciou nos efeitos das drogas foi o radical inserido na porção arilhidrazona do anel benzeno. Embora não haja muitas diferenças nos efeitos das concentrações testadas entre as classes tiosemicarbazona e tiazolidinona que possibilite afirmar que uma é melhor do que a outra, a variação de seus radicais (R1), tanto na posição quanto no elemento, foi responsável pelas variações dos efeitos. Por exemplo, o Cloro na posição 3 teve um resultado superior do que na posição 2 ou 4 (para as duas classes de drogas), assim como na posição 2,4-Cl foi muito mais efetivo do que na 3,4-Cl. Os radicais 3-Cl, 4-F, p-NO<sub>2</sub> se destacaram, enquanto os radicais 2-Cl e H na tiazolidinona apresentaram os piores resultados (Tabela 3).

Tabela 3 Radicais utilizados nos análogos das tiosemicarbazonas (em negrito) e tiazolidinonas em ordem decrescente de efeito após o tratamento com 1 mM por 24 h.

Efeitos dos radicais sobre a infecção	
3-Cl>	4-F> <b>p-NO<sub>2</sub></b> > <b>3-Cl</b> > H> 4-F> 2,4-Cl> <b>4-Cl</b> > 2-F> <b>3,4-Cl</b> > <b>2-F</b> > 4- Cl> 2-Cl> H
Efeitos dos radicais sobre o número de parasitas	
<b>p-NO<sub>2</sub></b> >	<b>4-F</b> > 2,4-Cl> <b>3-Cl</b> > <b>2-F</b> > 2-F> H> 4-F> 3-Cl> 4-Cl> <b>4-Cl</b> > <b>3,4-Cl</b> > 2-Cl> H

Após o estabelecimento da escala de efeito de citotoxicidade das drogas, os valores de DL 50, que é a concentração da dose letal para 50% da população, foram determinados tanto para a célula hospedeira quanto para os parasitos intracelulares (tabela 4). A DL 50 é um parâmetro de segurança para a célula hospedeira, uma vez que o valor do DL 50 para as células hospedeiras deve ser, pelo menos, dez vezes maior do que aquele dos amastigotas.

Para a maioria das drogas, os valores de LD 50 para amastigotas variaram entre 0,5 e 1,0 mM, enquanto grande parte do LD 50 para as células hospedeiras ficaram em torno de 7,5. Os compostos 3, 4, 6, 13 e 14 tiveram valores de LD 50 bastante aproximados, o que não é interessante para estes testes toxicológicos, contudo, outros como o 1, 7, 8, 9, 11 e 12, atenderam o requisito da concentração dez vezes maior .

Tabela 4 Valores de LD 50 (mM) para aos amastigotas e para as células Vero, após o tratamento com os 16 compostos por 24 h.

Composto	LD 50 (mM)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	BZN	HU
<b>Amastigotas</b>	0.5	1.5	0.5	0.8	1.2	3	0.5	0.5	0.8	1.5	0.5	0.5	1	0.8	3	0.1
<b>Cel. Hospedeiras</b>	7.4	7	2.4	2.4	8	2.5	7.8	7.6	7.9	7.4	7.6	7.4	4.3	3.5	20	>20

Como conclusão das análises quantitativas, sabe-se que os novos compostos levaram a eliminação do parasito após o tratamento com baixas concentrações durante 24 h e após a infecção

ter sido estabelecida. Visto que a parte central das drogas é comum a todas elas, a variação dos resultados e da citotoxicidade em relação à célula hospedeira é dependente do radical variante e seu posicionamento. A partir destes resultados houve, então, o interesse em observar o estágio e as características da eliminação do parasito intracelular. Para isto, o composto 1 que apresentou a melhor atividade, reduzindo drasticamente o número de amastigotas (figura 9) foi escolhido como o mais eficiente e promissor, ou seja, eliminou a maior quantidade de *T. cruzi*, em baixas concentrações e teve um valor de DI 50 dentro do esperado, sendo utilizado nos outros testes. Na figura 9, pode-se observar a alta taxa de infecção da célula hospedeira em diferentes aumentos (Fig. 9 A e C) e, após o tratamento, uma drástica eliminação dos parasitos (Fig. 9 B e D) e uma certa desorganização morfológica nos que restaram, contudo, as células hospedeiras mantiveram seu aspecto normal (Fig. 9 D).

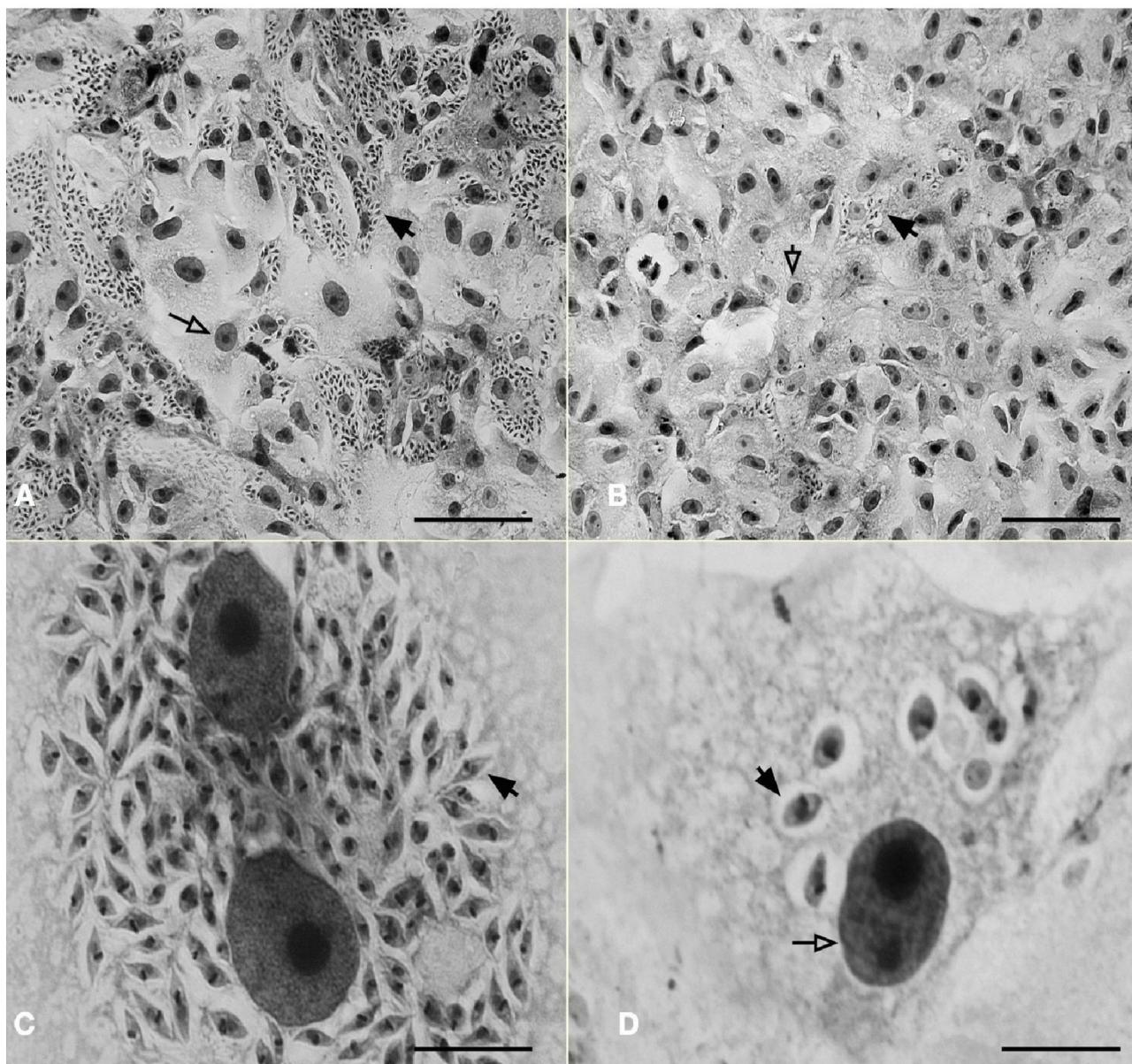


Figura 9 Efeito do composto 1 (TSC) sobre a multiplicação do *T. cruzi* intracelular. (A e C) Controle das células Vero infectadas com o parasito. (B e D) Cultura tratada com 1 mM do composto 1 por 24 h. Seta preta: parasitos, seta branca: núcleo da célula hospedeira. Barra de escala: A e B: 100  $\mu$ m, C e D: 10  $\mu$ m.

Outros ensaios foram feitos para compreender melhor o efeito da droga na cultura e, dentre eles estão o tempo de tratamento de 12 e 36 h e o teste de reversibilidade. Como já fora estabelecido que o tempo de multiplicação desta cepa do *T. cruzi* (DM 28) é de, aproximadamente, 8-10 h, este tempo e o 36 h foram escolhidos para estabelecer uma escala de efeito da droga e determinar se ela tem a ver com o ciclo de vida do parasito.

Os resultados destes testes mostraram que após 12 h de tratamento, houve uma pequena redução na porcentagem de infecção, porém o número de parasitos reduziu a metade. Em 24 h, como já visto houve uma grande diminuição em ambos parâmetros que chegaram a zero no tempo de 36 horas (Tabela 5). Com isto, é possível sugerir que o efeito da droga é dependente de um estágio específico do ciclo de vida do patógeno e o baixo efeito na redução dos parasitos em 12 h é devido a uma pequena parte deles se encontrarem na fase específica. E a diferença nos efeitos de redução da infecção e do número de parasitos é explicado porque, embora o parasito ainda esteja presente na célula, se ele não apresentar sua morfologia normal, ele não é considerado, contudo, a célula é contada como infectada.

Tabela 5 Porcentagem de infecção e número de amastigotas nas células Vero após diferentes tempos de tratamento com o composto 1 a 1 mM.

	% infecção		número de parasitas	
	controle	tratado	controle	tratado
<b>12 horas</b>	64±5	58±3	195±34	98±14
<b>24 horas</b>	84±12	37±5	5063±37	1965±45
<b>36 horas</b>	71±7	0	2390±56	0

O próximo teste realizado foi o de reversibilidade. O ensaio consistiu na retirada do meio de cultura contendo a droga 1 na concentração de 1 mM após 24 h de tratamento e a reposição do meio contendo somente o soro fetal bovino e a incubação por mais 24 h. Após este tempo as células foram observadas e não havia nenhum parasito na cultura, mostrando que embora ainda hajam amastigotas no interior da célula quando analisadas em 24 h, estes já estavam danificados de maneira irreversível ou mortos, embora ainda não tivessem sido eliminados (Fig. 10).

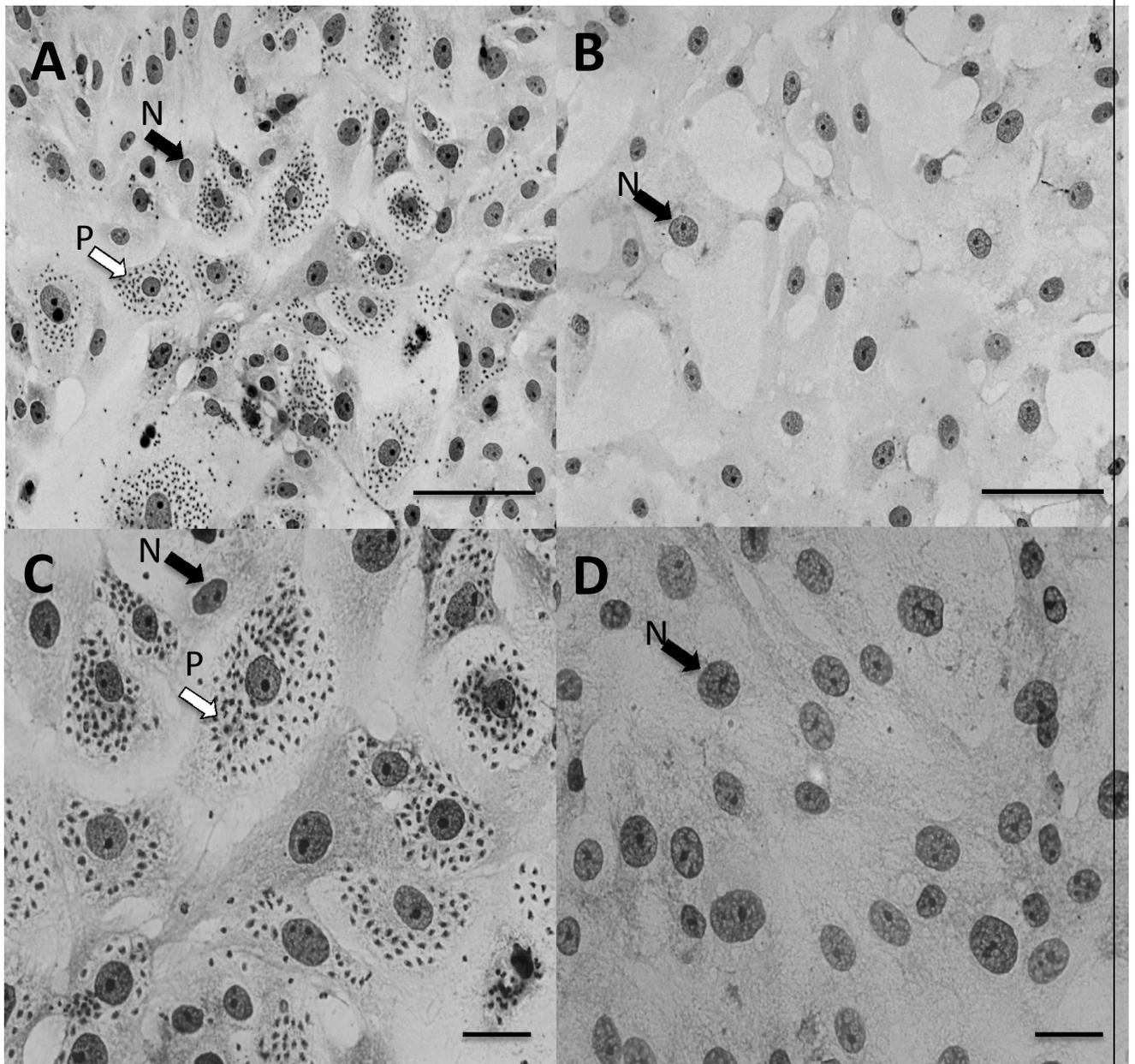


Figura 10 Teste de reversibilidade nas células Vero infectadas com *T. cruzi* por 24 h e incubadas com o composto 1 a 1 mM. A e C: culturas controles. B e D: após serem incubadas por 24 h com meio de cultura contendo o composto, este foi retirado e substituído por apenas o meio de cultura por mais 24 h. N: núcleo das células hospedeiras e P: parasitos. Barra de escala A e B= 40  $\mu\text{m}$  e C e D= 20  $\mu\text{m}$ .

Após estudos sobre os efeitos da droga sobre a cultura de célula hospedeira infectada com o parasito, os mecanismos de ação do composto 1 e as características do processo de eliminação do parasito foram estudadas mais profundamente por técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia óptica de fluorescência.

## 5.2 Analise ultraestrutural

Através da microscopia eletrônica de transmissão, os efeitos progressivos do composto 1 na morfologia e ultraestrutura do parasito puderam ser observados (Fig 11). Na cultura controle, as células Vero continham em seu citoplasma organelas morfologicamente normais, assim como amastigotas normais em proliferação (Fig 11 A). Na cultura tratada com o composto 1 a 1 mM por 24 h, alguns parasitos estavam no interior de vacúolos circundados por dupla membrana (Fig 11 B) e apresentavam drásticas alterações morfológicas em diferentes níveis (Fig 11 C). Tanto as alterações ocorridas no parasito quanto a sua eliminação aconteceram de forma assincrônica sugerindo, novamente, que o efeito da droga é dependente do ciclo de vida em que o parasito se encontra.

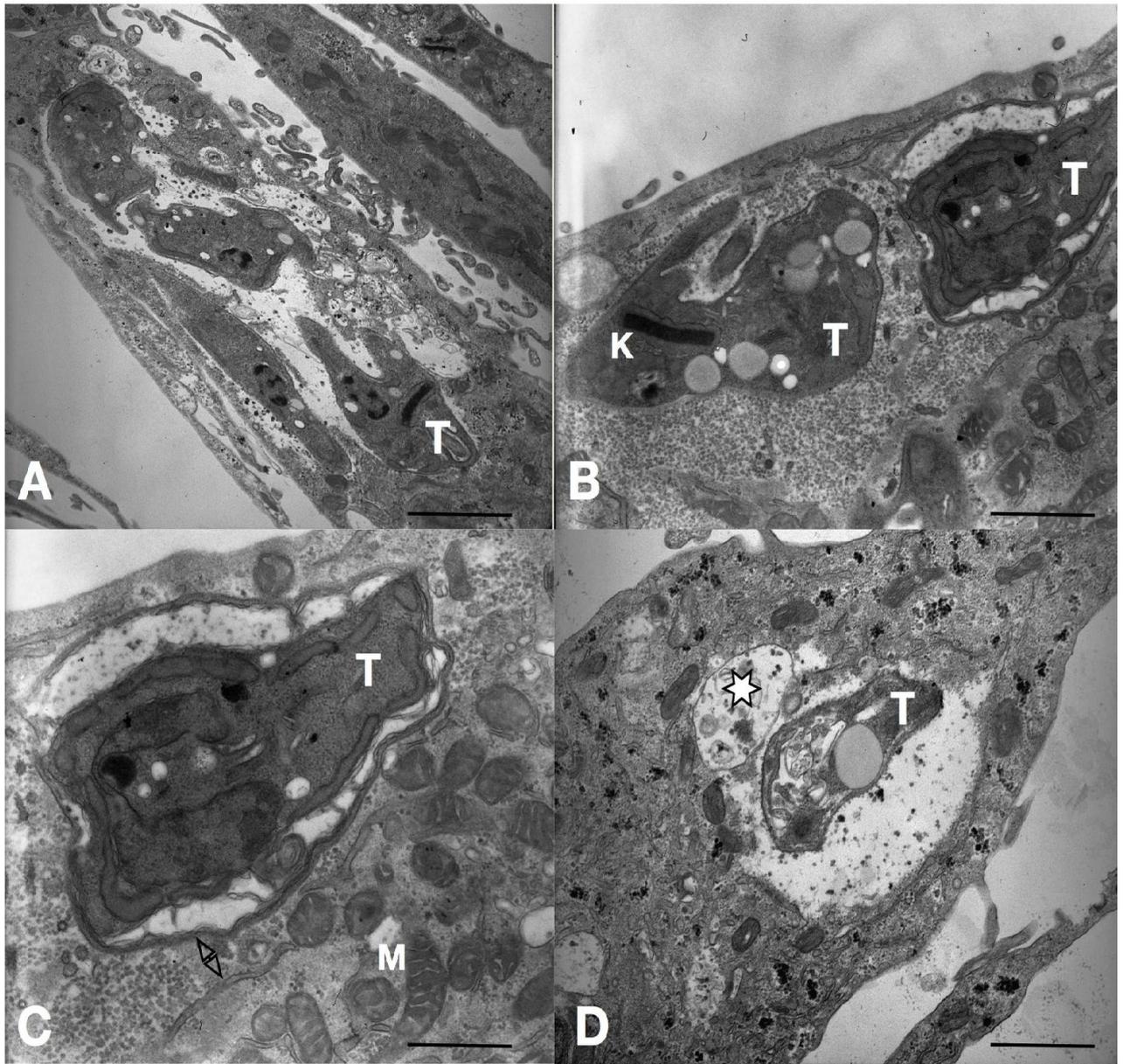


Figura 11 Análise ultraestrutural de células Vero infectadas com amastigotas de *T. cruzi* por 72 h. (a) Cultura controle. (b, c e d) células infectadas quando tratadas com 1 mM do composto 1 por 24 h mostraram parasitos em diferentes estágios de destruição no interior de um vacúolo delimitado por uma dupla membrana. Dupla seta: aproximação da dupla membrana que circunda o parasito com o retículo endoplasmático. Estrela: parasito em processo de destruição avançado onde a degradação do *T. cruzi* ocorre de dentro para fora. Barra de escala: A = 2  $\mu\text{m}$ ; B,D = 1  $\mu\text{m}$ ; C= 0.5  $\mu\text{m}$ .

### 5.3 Aspectos celulares da eliminação do parasito

Os ensaios posteriores foram feitos com o objetivo de reforçar a idéia de que o processo de autofagia estava ocorrendo. Para isto, o Laranja de Acridina (LA) que é um marcador vital indicativo de acidificação do pH, foi utilizado (Fig. 12). Já após o tratamento com o composto 1 por 12 h, foi possível observar o aumento da fluorescência em diferentes áreas do citoplasma da célula hospedeira, incluindo aquela onde o parasito se encontra (Fig. 12 C e D).

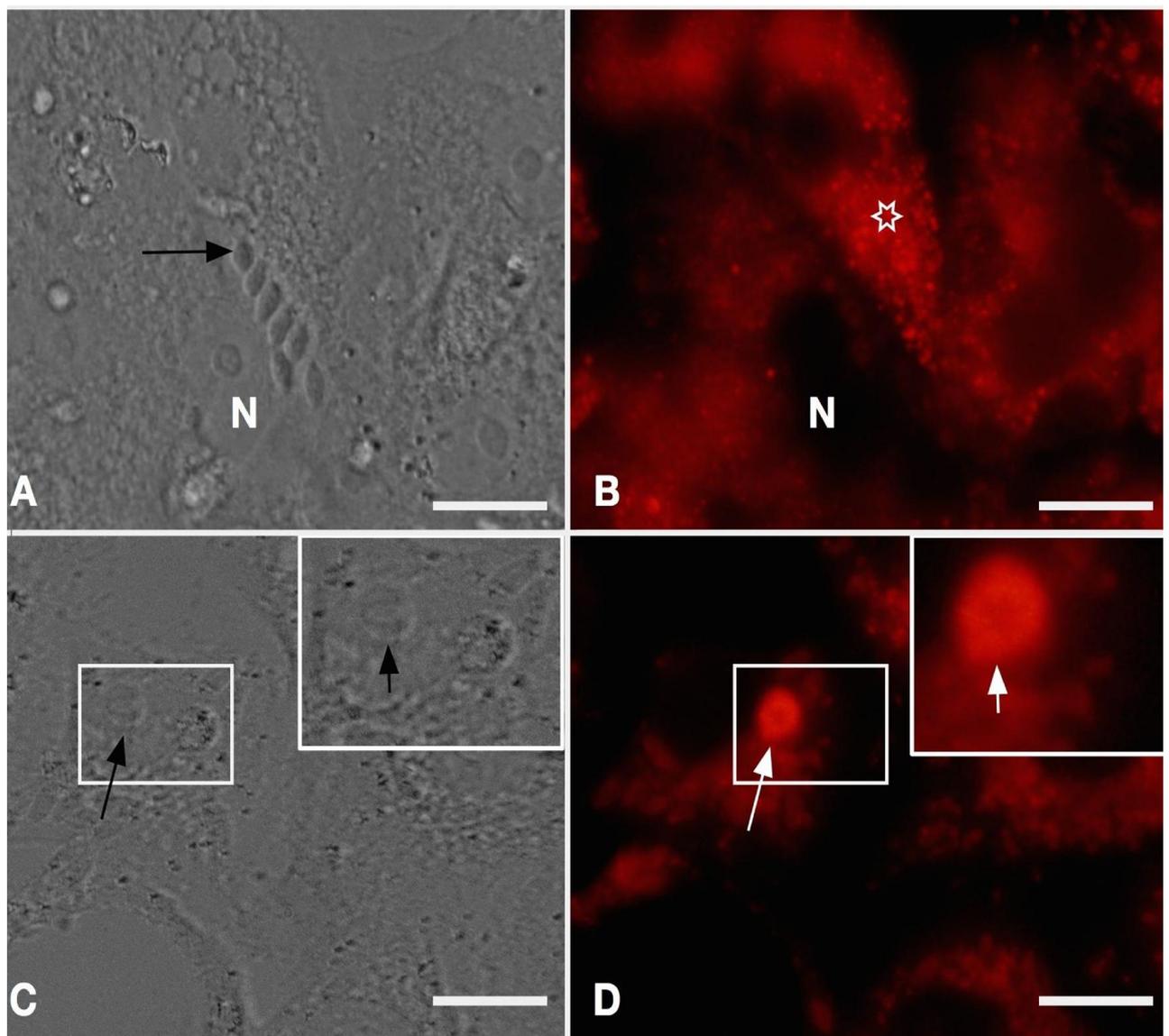


Figura 12 Células Vero infectadas com amastigotas de *T. cruzi* por 36 h e coradas com LA. (A e B) Culturas controle. (C e D) Células tratadas com o composto 1 a 1 mM durante 12 h. Setas pretas: amastigotas, setas brancas: aumento da acidificação no citoplasma, estrela: citoplasma da célula hospedeira, N: núcleo. Barra de escala: A-D= 50µm.

Um segundo ensaio com as mesmas condições, mas usando o marcador LysoTracker Red, que é específico para lisossomos (Fig. 13), também foi possível ver um aumento do número e da atividade destas organelas no local onde o parasito estava (Fig. 13 C e D). Ambos os resultados sugerem que está acontecendo um processo de digestão vacuolar com a participação de lisossomos.

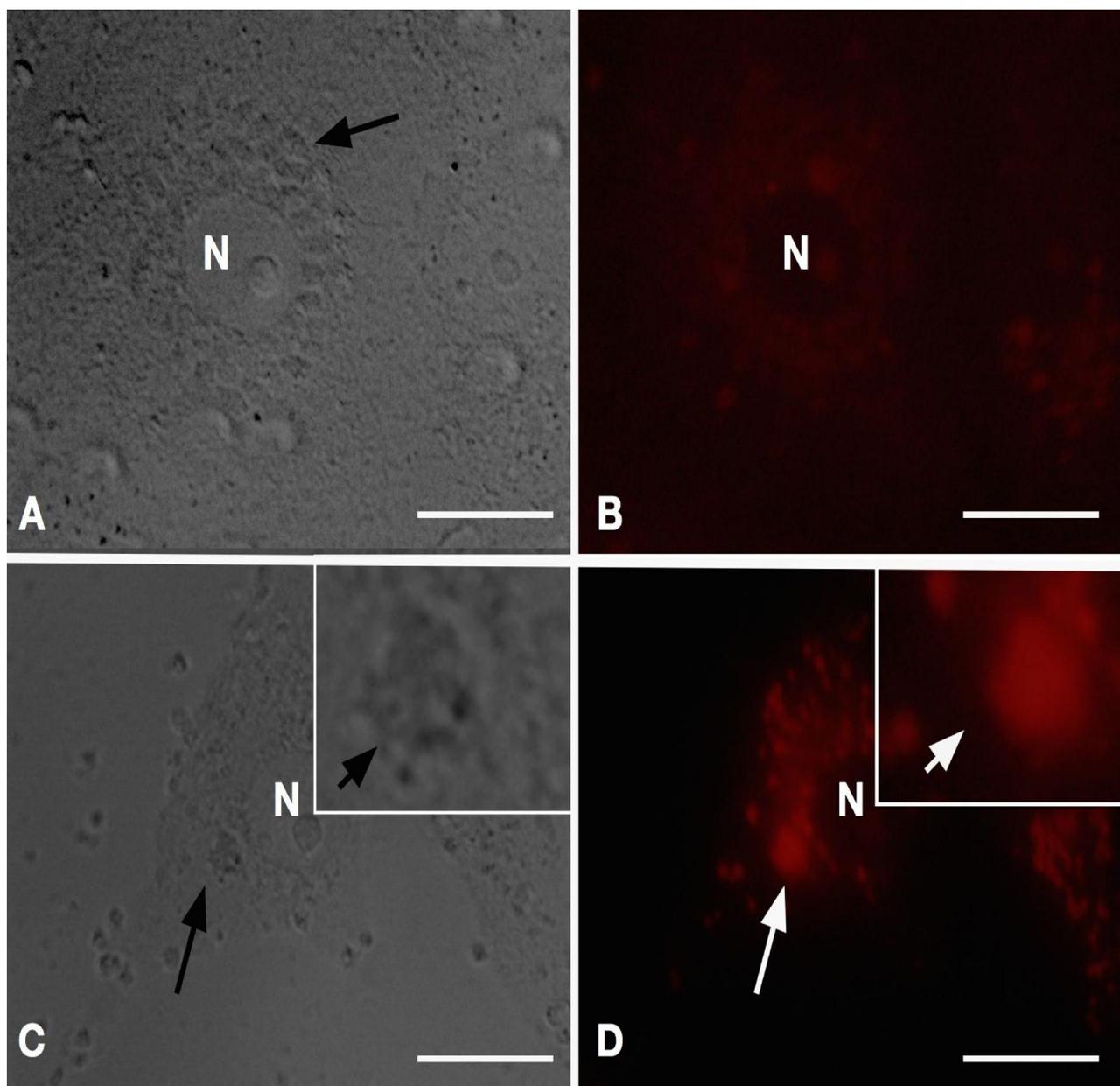


Figura 13 Células Vero infectadas com amastigotas de *T. cruzi* por 36 h e coradas com LysoTracker Red. (A e B) Células não tratadas e (C e D) células tratadas com o composto 1 a 1 mM por 12 h. Setas pretas: amastigotas e setas brancas: aumento da concentração de lisossomos colocalizados com os parasitos, N: núcleo da célula hospedeira. Barra de escala: A, B = 40  $\mu$ m; C,D= 20  $\mu$ m.

O terceiro experimento com marcadores fluorescentes foi feito utilizando o monodansylcadaverina (MDC), indicador de presença de vacúolos autofágicos. As marcações positivas presentes apenas nas células tratadas indicam que o processo de autofagia está envolvido na eliminação do *T. cruzi* do citoplasma da sua célula hospedeira (Fig. 14).

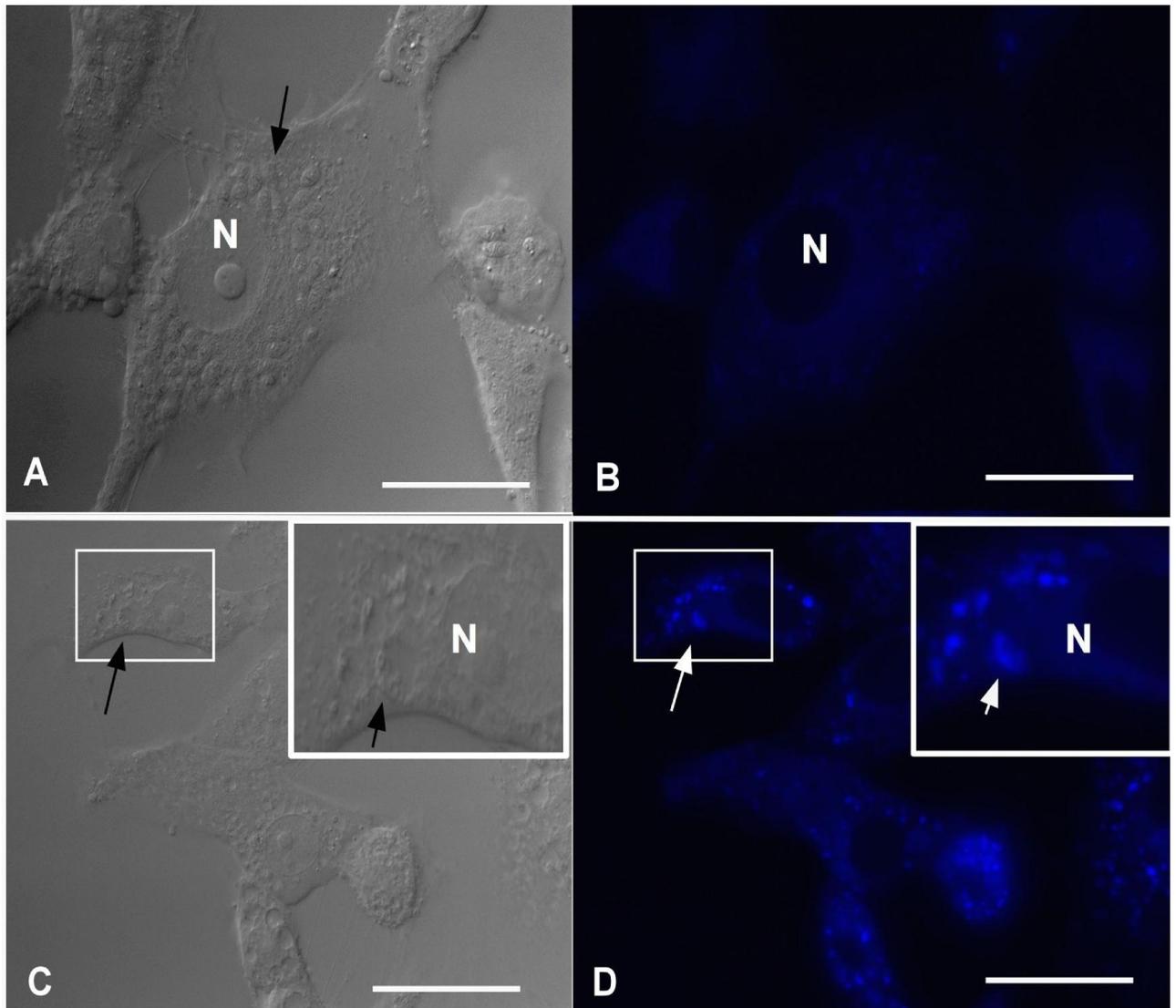


Figura 14 Células Vero infectadas com amastigotas de *T. cruzi* por 36 h e coradas com Monodansilcadaverina. (A e B) Cultura controle e (C e D) células tratadas com o composto 1 a 1 mM por 12 h. Setas pretas: amastigotas e setas brancas: vacúolos autofágicos contendo parasitos, N: núcleo da célula hospedeira. Barra de escala: A,B = 60  $\mu$ m; C,D= 100  $\mu$ m.



## 6 Discussão

A doença de Chagas tem uma grande incidência nas Américas Central e do Sul, tornando-se umas das principais doenças parasitárias destas regiões. No entanto, os dois tratamentos disponíveis para a doença, o Nifurtimox e o Benzonidazol são eficientes somente para as formas tripomastigotas e epimastigotas do parasito, sem ação para os amastigotas, responsáveis pela forma crônica da doença. Outras limitações destas duas drogas são seus sérios efeitos colaterais para o paciente e os casos de resistência do parasito. Devido a estes motivos, vários estudos vêm sendo realizados afim de proporem uma alternativa de tratamento para a doença que seja mais eficaz e menos prejudicial ao paciente (PÉREZ-REBOLLEDO; *et al.*, 2008) e, para isto, uma série de compostos naturais e sintéticos têm sido testados.

Tiosemicarbazonas e Tiazolidinonas vêm sendo bastante usadas em testes contra uma grande variedade de microorganismos e linhagens de células cancerígenas há mais de 50 anos. Isto porque, devido à alta capacidade de se ligarem a metais, podem formar complexos mais eficientes na eliminação da infecção e dificultarem o aparecimento de microorganismos resistentes (ARANCIBIA; *et al.*, 2014). O uso abrangente desta classe é, em partes, explicado pelo baixo peso molecular, boa capacidade de doar e receber pontes de hidrogênio, o baixo custo e a facilidade de ser sintetizada. Assim também acontece para a 4-Thiazolidinona, que é um sistema de anel que está presente em vários compostos farmacêuticos por apresentar uma grande variedade de atividades biológicas (OMAR; *et al.*, 2010).

As tiosemicarbazonas são usadas com frequência como composto base em testes para avaliar a atividade anti-protozoária, incluindo o *Trypanosoma cruzi*. Contudo, mesmo com os inúmeros ensaios existentes usando estas drogas, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação que culminam na eliminação do parasito intracelular. Com o desenvolvimento dos estudos sobre a biologia celular do *Trypanosoma cruzi*, vários possíveis alvos de drogas vêm sendo descritos. Alguns estudos têm mostrado que a eficiência dos compostos destas duas classes tem sido multifatorial, estando relacionada com a sua capacidade de inibir enzimas metálicas como a Ribonucleotídeo Redutase (KRISHNAN; *et al.*, 2008) e a cisteína protease (DU; *et al.*, 2002; GREENNAUM; *et al.*, 2004; LIMA; *et al.*, 2006), assim como também inibe a trypanotona redutase (PORCAL; *et al.*, 2008) e diminui a produção de óxido nítrico (um mecanismo de defesa dos tripanosomatídeos) (SOARES; *et al.*, 2011). A tiosemicarbazona inativa a ribonucleotídeo

redutase devido à sua capacidade de formar complexos com os metais presentes nas enzimas e, neste caso, atuando como quelante dos íons de ferro presentes na RNR que são indispensáveis para funcionamento da enzima (KRISHNAN; *et al.*, 2008). Uma vez sem o ferro, o ciclo celular é interrompido na fase G1 sem progredir para a fase S. Tratando-se da cisteína protease, esta tem sua atividade bloqueada pela tiosemicarbazona porque esta classe de droga é capaz de fazer um ataque nucleofílico com seu carbono carbonila ao resíduo Cys25 da protease (DU; *et al.*, 2002). Considerando as atuais drogas utilizadas no tratamento da doença de Chagas, já foi descrito que ambos o Nifurtimox e o Benzonidazol agem através da redução do grupamento nitro. No tratamento com o Nifurtimox, a redução gera radicais nitro ânion instáveis que produzirão espécies reativas de oxigênio bastante tóxicas. Já o Benzonidazol leva a modificação covalente de macromoléculas causada pelos intermediários do nitro. A toxicidade destes compostos se dá pelo dano redutivo ou oxidativo nos tecidos dos hospedeiros (AGUIRRE; *et al.*, 2004).

Apesar da grande quantidade de estudos feitos para avaliar a ação anti-*Trypanosoma cruzi* de novos compostos, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares que levam a eliminação deste patógeno da cultura, uma vez que na maioria dos testes só são feitas quantificações citotóxicas em epimastigotas. Entre alguns estudos que observaram as vias de morte de amastigotas estão: SANTA-RITA; *et al.*, (2000 e 2006) mostraram que os análogos edelfosina, miltefosina e ilmofofosina interrompem a biossíntese de fosfolípidos e esteróis, causando danos na membrana plasmática do parasito. MENNA-BARRETO; *et al.*, (2005 e 2007) mostraram que naftoimidazoles eram capazes de inibir a síntese de DNA. VIEITES; *et al.*, (2009) testou a atividade de 8 novas 3-(5-nitrofuril) acroleína tiosemicarbazonas acopladas com platina e mostrou que a produção de radicais livres e interação com o DNA eram as principais causas de morte dos amastigotas, também fazendo suas atividades serem melhores do que a do nifurtimox. MOREIRA; *et al.* (2014) que estudaram novas aril tiosemicarbazonas com diferentes substituintes no anel fenil, onde todos os compostos substituídos tiveram atividade melhor e foram menos tóxicos para as células hospedeiras do que o nifurtimox, e induziram a morte do parasito por apoptose. Todos estes trabalhos assim como vários outros citados por MENA-BARRETO; *et al.*, (2009) e RIVERA; *et al.*, (2009) mostram que uma série de compostos sintéticos e naturais têm como objetivo a destruição direta do parasito através de danos estruturais ou inibição de vias metabólicas.

As células, uma vez infectadas, são capazes que desencadear uma série de respostas imunológicas microbicidas que podem levar a eliminação da célula infectada e a um processo

inflamatório no hospedeiro. Porém, uma vez que a célula perde o controle da infecção, a ativação da resposta imune é comprometida. Contudo, há uma ausência de informações sobre a capacidade da célula infectada de eliminar seu próprio patógeno quando este se encontra no citoplasma. O conceito de apenas controlar a infecção, possibilitando que assim a célula hospedeira reestabeleça seus mecanismos microbicidas é muito pouco explorado.

Neste trabalho, o uso de drogas capazes de bloquear o ciclo celular do parasito possibilitou a observação de dois eventos importantes. O primeiro deles foi a capacidade da célula de retomar o controle da infecção uma vez que a proliferação do parasito foi interrompida. O segundo foi a observação de estruturas com características de autofagolisossomos e de eventos relacionados à autofagia envolvidos na eliminação deste parasito. De acordo com o que é citado em HAYASHI-NISHINO; *et al*, (2009) e GLICK, BARTH e MACLEOD, (2010) durante o processo de autofagia há o isolamento da partícula a ser degradada por uma dupla membrana com marcadores específicos e que cuja origem é o retículo endoplasmático. Uma vez que esta dupla membrana engolfa a partícula, há a formação do autofagossomo e o recrutamento e fusão local de lisossomos que liberam hidrolases ácidas para degradar a partícula. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a ocorrência de todos estes fatos. Análises de microscopia eletrônica de transmissão mostram o parasito envolvido por uma dupla membrana bem próximo ao retículo endoplasmático. Assim como a destruição assincrônica dos parasitos, indicando que esta é dependente do seu ciclo celular. A microscopia óptica de fluorescência mostra que, após o tratamento da cultura, há grande presença de lisossomos e a ocorrência da acidificação colocalizados com o parasito, como também é possível ver marcações específicas para vacúolos autofágicos circundando o *T. cruzi*.

Apesar de a autofagia ser um processo descrito para eliminar uma grande variedade de microorganismos intracelulares como descrito em DERETIC e LEVINE, (2009) e estimular a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, este mecanismo ainda não tinha sido observado na eliminação de parasitos que habitam o citoplasma da célula hospedeira. Ao considerar que o tratamento só ocorre após 24 horas de infecção, e que os parasitos já escaparam do vacúolo parasitóforo e encontram-se no citoplasma da célula hospedeira em multiplicação, é possível supor que um processo autofagico é montado pela célula para eliminar este patógeno na presença da droga. A possibilidade da célula hospedeira conseguir eliminar uma infecção uma vez que esta é controlada é de grande importância biológica visto que pode ser abrangente a outros microorganismos intracelulares, inclusive os que também vivem no citoplasma. Esta questão é

realmente possível uma vez que também já foi demonstrada por CARVALHO e MELO, (2006). Eles observaram que células Vero infectadas com *T. gondii* e tratadas com Hidroxiurea tornavam o vacúolo parasitóforo onde o parasito residia permissivo a fusão com lisossomos, acidificando-o e levando a morte deste parasito.

Outros estudos também utilizando Tiosemicarbazonas e Tiazolidinonas mostraram a atividade destas drogas contra protozoários, inclusive o *T. cruzi* (CAPUTTO; *et al.*, 2011; LEITE; *et al.*, 2006; SOARES; *et al.*, 2011; MOREIRA; *et al.*, 2014). Todos estes trabalhos, e também o presente estudo mostraram que a atividade do composto é dependente tanto dos radicais em si quanto da sua posição (meta, orto e para). Neste estudo foram usados os radicais H, F, Cl, NO<sub>2</sub> conjugados aos anéis das tiosemicarbazonas e 4-tiazolidinonas em diferentes quantidades e posições. Os mesmos análogos utilizados aqui contra o *T. cruzi* já foram usados em outros trabalhos contra o *Toxoplasma gondii* (TENÓRIO; *et al.*, 2005 ; AQUINO; *et al.*, 2008 ; CARVALHO; *et al.*, 2010), onde também se pode ver a influência da variação dos radicais e seus posicionamentos, confirmando a relação estrutura atividade. Alguns destes compostos capazes de eliminar, parcialmente ou completamente, o *T. gondii* da célula, o que é um fato muito interessante, sugerindo que um mesmo composto pode ser efetivo no tratamento de diversas doenças.

Embora nosso grupo já tenha sintetizado compostos de alta eficiência em eliminar parasitos intracelulares, novos estudos vêm sendo feitos como alternativas para o tratamento de doenças causadas por protozoários, assim como para outras doenças causadas por microorganismos intracelulares. A razão pela qual os 14 análogos terem sido testados é de se ter uma diversidade para o tratamento da doença afim de dificultar que o patógeno em questão adquira resistência ao novo composto. Também, tenta-se aumentar cada vez mais a eficiência destas novas drogas. Por estes motivos, muitos análogos destas classes vêm sendo sintetizados e testados contra uma série de microorganismos incluindo bactérias, fungos e protozoários.

Outra alternativa para aumentar a eficiência do composto e evitar a resistência do parasito, têm sido a utilização de metais complexados a classes de drogas que já vêm sendo estudadas. Esta prática recebeu grande importância a partir do abrangente uso e eficácia da cisplatina no tratamento de diversos tipos de câncer, a partir da década de 70 (KELLAND, 2007). Atualmente, vários grupos vêm sintetizando complexos metálicos utilizando tiosemicarbazonas, testando suas atividades

contra diversos protozoários (GAMBINO, 2011; SANTOS; *et al.*, 2012) e obtendo bons resultados, contudo os mecanismos de eliminação destes parasitos ainda não foram explorados.

## **7 Conclusão**

Embora com eficiências diferentes, todos os 14 novos compostos testados apresentaram atividades anti-*Trypanosoma cruzi* nas quatro concentrações vistas, sendo a de 0,1 mM pouco efetiva e 10 mM tóxicas para ambos parasito e célula hospedeira. Contudo, as concentrações intermediárias de 1 e 5 mM mostraram-se bastante eficientes em eliminar o patógeno da cultura, sem causar danos as células hospedeiras, com excessão para os compostos 10 e 14. Estes resultados mostram como a variação tanto dos radicais quanto da posição na qual eles são inseridos interferem na atividade do análogo, e mostram a importância de se ter alternativas para o tratamento da doença.

A utilização de compostos pertencentes à estas duas classes de drogas mostraram que uma vez a replicação do parasito é interrompida, a própria célula é capaz de eliminá-los. Os estudos de microscopia sugerem que o mecanismo que a célula usou nas condições testadas foi a autofagia. Este é um fato muito importante uma vez que pouco se sabe sobre mecanismos microbicidas contra microorganismos que vivem no citoplasma da célula hospedeira, assim como o uso destas drogas podem se tornar uma ferramenta de estudo de outros patógenos com o mesmo estilo de vida.

## REFERÊNCIAS

1. CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, p. 159-218, 1909.
2. SANCHÉZ-VALDÉZ, F. J.; *et al.*, *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. *Molecular Immunology*, v. 53, p. 198-205, 2013.
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesado em: 18/02/2015.
4. GERPE, A.; *et al.* Naftifine-analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 2154-2164, 2010.
5. TYLER, K. M. and ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 472-481, 2001.
6. OSÓRIO, L.; *et al.* Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and Infection*, v. 14, p. 1390-1402, 2012.
7. DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 269-285, 2002.
8. MARTINS, A. V.; *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: an update. *Infectio*, v. 16, p. 45-58, 2012.
9. NAVARRO, M. C.; *et al.* Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, 2003.
10. [http://dna.kdna.ucla.edu/parasite\\_courseold/cruzi\\_files/subchapters/morphology%20and%20life%20cycle.htm](http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_courseold/cruzi_files/subchapters/morphology%20and%20life%20cycle.htm) Acessado em 24/02/2015.
11. FLORÊNCIO-MARTÍNEZ, L.; *et al.* Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 126, p. 332–336, 2010.
12. BANSAL, D. and CAMPBELL, K. P. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in Cell Biology*, v.14, p. 206–213, 2004.
13. YOSHIDA, N. and CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Sub-Cellular Biochemistry*, v. 47, p. 82–91, 2008
14. ROSESTOLATO, C. T.; *et al.* Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function*, v. 27, p. 91–98, 2002.
15. PREVIATO, L. M.; *et al.* Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Advanced Parasitology*, v.56, p.1–41, 2000.
16. ALVES, M. J. and COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*, v. 59, p. 274–279, 2007.
17. EL-SAYED, N. M.; *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409–415, 2005.
18. KULKARNI, M. M.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. *Infection Immunology*, 77, 2193–2200, 2009.

19. ANDREWS, N.W.; *et al.* **Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Experimental Parasitology*, v. 64, p.474–8, 1987
20. SCHENKMAN, S.; *et al.* **Structural and functional properties of *Trypanosoma trans-sialidase*.** *Annual Review of Microbiology*, v. 48, p. 499–523, 1994.
21. VILLALTA, F. and KIERSZENBAUM F. **Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 119, p. 228–235, 1984.
22. YOSHIDA, N.; *et al.* **Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*.** *Infection and Immunity*, v. 57, p. 1663–1667, 1989.
23. DORTA, M. L.; *et al.* **Ca +2 signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion.** *Molecular Biochemistry Parasitology*, v. 73, p. 285–289, 1995.
24. FRASCH, A. C. C. **Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitology Today*, v. 16, p. 282–286, 2000.
25. TOMLINSON, S; *et al.* **Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement.** *Journal of Immunology*, v. 153, p. 3141–3147, 1994.
26. LIMA, M. F. and VILLATA, F. **Host-cell attachment by *Trypanosoma cruzi*: identification of an adhesion molecule.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 155, p. 256–262, 1988.
27. ORTEGA-BARRIA, E. and PEREIRA, M. E. A. **A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells.** *Cell*, v. 67, p. 411–421, 1991.
28. SCHARFSTEIN, J.; *et al.* **Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 192, p. 1289–1299, 2000.
29. BURLEIGH, B. A.; *et al.* **A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells.** *Journal of Cell Biology*, v. 136, p. 609–620, 1997.
30. GRELLIER, P.; *et al.* **Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes.** *Molecular Biochemistry Parasitology*, v. 98, p. 239–252, 1999.
31. VRAY, B.; *et al.* **Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells.** *Glycobiology*, v. 14, p. 647–657, 2004.
32. KLESHCHENKO, Y. Y. and MOODY, T. N. **Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smoothmuscle cells.** *Infection and Immunity*, v. 72, p. 6717–6721, 2004.
33. WEINKAUF, C. and PERRIN, M. P. ***Trypanosoma cruzi* promotes neuronal and glial cell survival through the neurotrophic receptor TrkC.** *Infection and Immunity*, v. 77, p. 1368–1375, 2009.
34. VIEIRA, M. C. F.; CARVALHO, T. U. and DE SOUZA, W. **Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*.** *Biochemistry Biophysical Research Community*, v. 203, p. 967-971, 1994.
35. BARRIAS, E. S.; *et al.* **Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages.** *PLOS ONE*, v. 5, p. 1–11, 2010.
36. DVORAK J. A. and HYDE, T. P. ***Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. Individual interactions at the cellular and subcellular levels.** *Experimental Parasitology*, v. 34, p. 268–283, 1973.

37. TANOWITZ, H.; *et al.* **Studies of *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 24, p. 25–33, 1975.
38. NOGUEIRA, N. and COHN, Z. ***Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells.** Journal of Experimental Medicine, v. 143, p. 1402–1420, 1976.
39. DE ARAÚJO-JORGE, T. C. **The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, p. 441–462, 1989.
40. SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S. and NUSSENZWEIG, V. **Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton.** Infection Immunology, v. 59, p. 645–654, 1991.
41. MILDER, R. and KLOETZEL, J. **The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate.** Parasitology, v. 80, p. 139–145, 1980.
42. MEIRELLES, M. N. and DE SOUZA, W. **Interaction of lysosomes with endocytic vacuoles in macrophages simultaneously infected with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*.** Journal of Submicroscopy Cytology, v. 15, p. 889–896, 1983.
43. DE CARVALHO, T.M. and DE SOUZA, W. **Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages.** Cell Structure and Function, v. 14, p. 383–392, 1989.
44. TARDIEUX, I.; *et al.* **Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells.** Cell, v. 71, p. 1117–1130, 1992.
45. TARDIEUX, I.; HATHANSON, M. H. and ANDREWS, N. W. **Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic- free Ca<sup>2+</sup> transientes.** Journal of Experimental Medicine, v. 179, p. 1017–1022, 1994.
46. WOOLSEY, A.M.; *et al.* **Novel PI 3-kinase- dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation.** Journal of Cell Science, v. 116, p. 3611–3622, 2003.
47. WOOLSEY, A.M.; *et al.* **Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments.** Cellular Microbiology, v.6, p. 829-838, 2004.
48. ANDRADE, L. O. and ANDREWS, N. W. **Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells.** The Journal of Experimental Medicine, v. 200, p. 1135-43, 2004.
49. ANDRADE, L. O. and ANDREWS, N. W. **The *Trypanosoma cruzi* - host-cell interplay: location, invasion, retention.** Nature reviews of Microbiology, v. 3, p. 819-23, 2005.
50. DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U. and BARRIAS, E. S. **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction.** International Journal of Cell Biology, 2010.
51. BARRIAS, E. S.; *et al.* ***Trypanosoma cruzi* : entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation.** Frontiers in Immunology, v. 4, p. 1-10, 2013.
52. <http://www.hsph.harvard.edu/barbara-burleigh/research/>. Acessado em 19/02/2015
53. ANDREWS, N. W. and WHITLOW, M. B. **Secretion of *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH.** Molecular and Biochemical Parasitology, v. 33, p. 249–256, 1989.
54. LEY, V.; *et al.* **The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments.** Journal of Experimental Medicine, v. 171, p. 401–413, 1990.

55. TOMLINSON, S.; *et al.* **The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH.** Parasitology, v. 110, p. 547–554, 1995.
56. GRELLIER, P.; *et al.* **Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes.** Molecular Biochemistry Parasitology, v. 98, p. 239–252, 1999.
57. TONELLI, R. R.; *et al.* **L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** Cellular Microbiology, v. 6, p. 733–741, 2004.
58. ALVES, M. J. and COLLI, W. ***Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival.** IUBMB Life, v. 59, p. 274–279, 2007.
59. TEIXEIRA, S. M. **Control of gene expression in Trypanosomatidae.** Brazilian Journal of Medicinal and Biology Research 31, 1503–1516, 1998.
60. TEIXEIRA, S. M. and DAROCHA, W. D. **Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae.** Genetic and Molecular Research, v. 2, p. 148–158, 2003.
61. BURLEIGH, B. A. and WOOLSEY, A. M. **Microreview cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion.** Cellular Microbiology, v. 4, p. 701-711, 2002.
62. DE SOUZA, W. **Structural organization of *Trypanosoma cruzi*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 89-100, 2009.
63. MARTINEZ-PALOMO, A.; DE SOUZA, W. and GONZALES-ROBLES, A. **Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembranous particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*.** Journal of Cell Biology, v. 69, p. 507-513, 1976.
64. DE MELO, L. D.; *et al.* **Evolutionary conservation of actin binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue.** Parasitology, v. 135, p. 955-965, 2008.
65. SOARES, M. J.; *et al.* **A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology Research, v. 75, p. 522-527, 1989.
66. RIOU, G. and YOT, P. **Heterogeneity of the Kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*.** Biochemistry, v. 16, p. 2390-2392, 1977.
67. SOUTO-PADRÓN, T. and DE SOUZA, W. **Ultrastructural localization of basic proteins in *Trypanosoma cruzi*.** Journal Histochemical Cytochemistry, v. 26, p. 349-358, 1978.
68. OPPERDOES, F. R. and BORST, P. **Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome.** FEBS Letters, v. 80, p. 360, 1977.
69. OPPERDOES, F. R. and COTTON, D. **Involvement of the glycosome of *Trypanosoma brucei* in carbon dioxide fixation.** FEBS Letters, v. 143, p. 60-64, 1982.
70. OPPERDOES, F. R. **Compartmentalization of carbohydrate metabolism in trypanosomes.** Annual Review of Microbiology, v. 41, p. 127-151, 1987.
71. VERCESI, A. E.; MORENO, S. N. J. and DOCAMPO, R. **Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*.** Biochemical Journal, v. 31, p. 304-309, 1994.
72. DOCAMPO, R.; *et al.* **Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*.** Biochemical Journal, v. 310, p. 1005-1012, 1995.

73. BENCHIMOL, M. and DE SOUZA. **Functional expression of a vacuolar-type H-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*.** Biochemical Journal, v. 332, p. 695-702, 1998.
74. SCOTT, D. A.; *et al.* **Presence of a plantlike proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*.** Journal of Biological Chemistry, v. 34, p. 22151-22158, 1998.
75. MIRANDA, K.; *et al.* **Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition.** Protist, v. 155, p. 395-405, 2004.
76. DOCAMPO, R.; *et al.* **Acidocalcisomes conserved from bacteria to man.** Nature Review Microbiology, v. 3, p. 251-261, 2005.
77. SIBLEY, D. **Invasion and intracellular survival by protozoan parasites.** Immunology Review, v. 240, p. 72-92, 2011.
78. VICKERMAN, K. **Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes.** British Medical Bulletin, v. 41, p. 105-114, 1985.
79. BROWN, S. P.; *et al.* **Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalis, plasticity and control.** Trends in Microbiology, v. 20, p. 442-446, 2012.
80. PIENZA, L.; *et al.* **Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence.** International Journal for Parasitology, v. 39, p. 1455-1464, 2009.
81. EPTIN, C. L.; *et al.* **Experimental parasitology molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** Experimental Parasitology, v. 126, p. 283-291, 2010.
82. BRISSE, S.; *et al.*, **A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome. Project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting.** Molecular Biochemistry and Parasitology, v. 92, p. 253-263, 1998.
83. NORIS, K. A., *et al.* **Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor.** Journal of Immunology, v. 147, p. 224-2247, 1991.
84. TAMBOURGI, D. V.; *et al.* **A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF.** Infection Immunology, v. 61, p. 3656-3663, 1993.
85. VALCK, C.; *et al.* **Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin.** Molecular Immunology, v. 47, p. 1516:1521, 2010.
86. BUSCAGLIA, C. A.; *et al.* ***Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity.** Nature Review Microbiology, v. 4, p. 229:236, 2006.
87. MARTINS, P.; *et al.* **Developmental expression of a *Trypanosoma cruzi* phosphoinositide-specific phospholipase C in amastigotes and stimulation of host phosphoinositide hydrolysis.** Infection Immunology, v. 78, p. 4206:4212, 2010.
88. MORO, A.; *et al.* **Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection.** The EMBO Journal, v. 14, p. 2483:2490, 1995.
89. UNDERHILL, D. M. and OZINSKY, A. **Phagocytosis of microbes: complexity in action.** Annual Review of Immunology, v. 20, p. 825-852, 2002.
90. MEIJER, A. J. and CODOGNO, P. **Regulation and role of autophagy in mammalian cells.** International Journal of Cell Biology, 36, 245-262, 2004.

91. DERETIC, V. and LEVINE, B. **Autophagy, immunity and microbial adaptations.** Cell Host and Microbe, v .5, p. 527-549, 2009.
92. SEGLEN, P. O. and BOHEY, P. **Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms.** Experientia, v. 48, p. 891-909, 1992.
93. ROMANO, P. S.; ARBOIT, M. A. and VAZQUEZ, C. L. **The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell.** Autophagy, v. 5, p. 6-18, 2009.
94. ROMANO, P. S.; *et al.* **The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burneii* to efficiently replicate in the host cell.** Cell Microbiology, v. 9, p. 891-909, 2007.
95. BRENER, Z. **Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeído- semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.** Revisão do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 3, p. 43-49, 1961.
96. COURA, J. R. and DE CASTRO, S. L. **A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 3-24, 2002.
97. URBINA, J. A. and DOCAMPO, R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances.** Trends in Parasitology, v. 19, p. 495-501, 2003.
98. RASSI JR, A.; RASSI, A. and MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease.** Lancet, 375, 1388–1402, 2010.
99. DOCAMPO, R. **Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs.** Chemico-Biological Interactions, v, 73, p. 1-27, 1990.
100. MAYA, J. D.; *et al.* **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host.** Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology, v. 146, p. 601-20, 2007.
101. POLAK, A and RICHLE, R. **Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 72, p. 228- 232, 1978.
102. DE TORANZO, E. G. D.; *et al.* **Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*.** Experientia, v. 44, p. 880–881, 1988.
103. URBINA, J. A. **Chemotherapy of Chagas disease.** Current Pharmaceutical Design, v. 8, p. 287-295, 2002.
104. URBINA, J. A., *et al.* **Cure of short- and long- term experimental Chagas disease using D0870.** Science, 273, 969-971, 1996.
105. HERNANDEZ, A. A and ROUSH, W. R. **Recent advances in the synthesis, design and selection of cysteine protease inhibitors.** Current Opinion in Chemical Biology, v .6, p. 459-465, 2002.
106. NERES, J.; BRYCE, R. and DOUGLAS, K. T. **Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease.** Drug Discovery Today, v. 3, p. 110-7, 2008.
107. CUPELLO, M. P.; *et al.* **The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters.** Acta Tropica, v.120, p. 211-8, 2011.
108. BÚA, J. *et al.* **Anti-*Trypanosoma cruzi* effects of cyclosporin A derivatives: possible role of a P-glycoprotein and parasite cyclophilins.** Parasitology, v. 135, p. 217-228, 2008.
109. HAMMARTON, T. C.; MOTTRAM, J. C. and DOERIG, C. **The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation.** Progress in Cell Cycle Research, v.5, p. 91-101, 2003.

110. MUNRO, J. B. and SILVA, J. C. Ribonucleotide reductase as a target to control apicomplexan disease. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 14, p. 9-26, 2012.
111. REIS, D. C.; *et al.* **Antimony (III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3904-10, 2010.
112. PELOSI, G. **Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity.** *The Open Crystallography*, v. 3, p. 16-28, 2010.
113. KUÇUKGUZEL, G.; *et al.*, **Synthesis and biological activity of 4-thiazolidinones, thiosemicarbazides derived from diflunisal hydrazide.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, p. 353-369, 2006.
114. VICINI, P. **Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 3859-3864, 2006.
115. CARVALHO, C. S.; *et al.* **Anti-parasitic action and elimination of intracellular *Toxoplasma gondii* in the presence of novel thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives.** *Brazilian Journal of Medicinal Biology Research*, v. 43, p. 139-149, 2010.
116. GREENNAUM, D. C. *et al.* **Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 3212-3219, 2004.
117. MELO, E. J. T.; *et al.* **Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication.** *FEMS Microbiology Letters*, 185, 79-82, 2000.
118. MELO, E. J. T. and BEIRAL, H. J. **Effect of Hydroxyurea on the intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 65-69, 2003.
119. VERNA, A. and SARAF, S. K. **4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 897-905, 2008.
120. TENÓRIO, R. P.; *et al.* **Synthesis of thiosemicarbazones and 4-thiazolidinone derivatives and their *in vitro* anti-*Toxoplasma gondii* activity.** *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*, v. 12, p. 2151-2161, 2005.
121. AQUINO, T. M.; *et al.* **Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids.** *Bioorganic & Medicine Chemistry*, v. 16, p. 446-456, 2008.
122. LIESEN, A. P.; *et al.* **Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 1-7, 2010.
123. GOMES, M. A. G. B.; *et al.* **Evaluating anti-*Toxoplasma gondii* activity of a new serie of phenylsemicarbazone and phenylthiosemicarbazone *in vitro*.** *Medicinal Chemistry Research*, v. 22, p. 3574-3580, 2013.
124. BIEDERBICK, A.; *et al.* **Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles.** *European Journal of Cell Biology*, v. 66, p. 3-14, 1995.
125. PÉREZ-REBOLLEDO, A.; *et al.* **4-Nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant *in vitro* anti-trypanosomal activity.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 939-948, 2009.

126. ARANCIBIA, R.; *et al.* **Synthesis, characterization and in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* evaluations of cyrhrenyl and ferrocenyl thiosemicarbazones.** Journal of Organometallic Chemistry, v. 755, p. 1-6, 2014.
127. OMAR, K.; *et al.* **Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 18, p. 426-432, 2010.
128. KRISHNAN, K.; *et al.* **Synthesis and ribonucleotide reductase inhibitory activity of thiosemicarbazones.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 18, p. 6248-6250, 2008.
129. DU, X.; *et al.* **Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 45, p. 2695-2707, 2002.
130. LIMA, A. C.; *et al.* **Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 14, p. 3749-3757, 2006.
131. PORCAL, W.; *et al.* **New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 16, p. 6995-7004, 2008.
132. SOARES, R. O. A.; *et al.* **Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*.** Experimental Parasitology, v. 129, p. 381-387, 2011.
133. AGUIRRE, G.; *et al.* **In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 12, p. 4885-4893, 2004.
134. SANTA-RITA, R. M.; *et al.* **Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** Acta Tropica, v. 75, p. 219-228, 2000.
135. SANTA-RITA, R. M., BARBOSA, H. S. and DE CASTRO, S. L. **Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology Research, v. 100, p. 187-190, 2006.
136. MENNA-BARRETO, R. F. S.; *et al.* **Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 56, p. 1034-1041, 2005.
137. MENNA-BARRETO, R. F. S.; *et al.* **Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from  $\beta$ -lapachone.** Parasitology Research, v. 101, p. 895-905, 2007.
138. VIEITES, M.; *et al.* **Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl) acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity.** Journal of Inorganic Biochemistry, v. 103, p. 411-418, 2009.
139. MOREIRA, D. R. M.; *et al.* **Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 75, p. 467-78, 2014.
140. MENNA-BARRETO, R. F. S.; *et al.* **Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study.** Micron, v. 40, p. 157-168, 2009.
141. RIVERA, G.; *et al.* **New Therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi*, advances and perspectives.** Current Medicinal Chemistry, v. 16, p. 3286-3293, 2009.
142. HAYASHI-NISHINO, M.; *et al.* **A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation.** Nature Cell Biology, v. 11, p. 1433-1437, 2009.
143. GLICK, D; BARTH, S and MACLEOD, K. F. **Autophagy: cellular and molecular mechanisms.** Journal of Pathology, v. 221, p. 3-12, 2010.

144. DERETIC, V and LEVINE, B. **Autophagy, immunity and microbial adaptations.** Cell Press, v.5, p. 527-547, 2009.
145. CARVALHO, C. S. and MELO, E. J. T. **Acidification of the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii* in the presence of hydroxyurea.** Anais da Academia Brasileira de Ciência, v. 78, 2006.
146. CAPUTTO, M. E.; *et al.* **Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 19, p. 6818–6826, 2011.
147. LEITE, A. C. L.; *et al.* **Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 14, p. 3749–3757, 2006.
148. KELLAND, L. **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.** Nature Review of Cancer, v. 7, p. 573–584, 2007.
149. GAMBINO, D. **Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents.** Coordination Chemistry Reviews, v. 255, p. 2193-2203, 2011.
150. SANTOS, D.; *et al.* **Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 1-indanones.** Journal of Inorganic Biochemistry, v. 117, p. 270-6, 2012.



## Anti-Parasite effects of new Thiosemicarbazones and their Products Thiazolidinone including Cellular aspects of Intracellular Elimination of *Trypanosoma Cruzi in Vitro*

Lais P de Carvalho<sup>1</sup>, Marco A G B Gomes<sup>2</sup>, Barbara S Rocha<sup>2</sup>, Rodrigo R de Oliveira<sup>2</sup>, Edmilson J Maria<sup>2</sup> and Edésio J T de Melo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell Biology and Tissue, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro Avenue Alberto Lamego, 2000 Cause California, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Chemical Sciences Laboratory, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro Avenue Alberto Lamego, 2000 Cause California, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

### Abstract

*Trypanosoma cruzi*, agent of Chagas disease in humans, invades and replicates within a wide variety of nucleated mammalian cells until the lysis of the host cells. This study was undertaken to evaluate the cellular features of effect of new compounds of thiosemicarbazone and their thiazolidinone derivate on the multiplication of extra- and intracellular *T. cruzi*. Most of the compounds interrupted epimastigote proliferation at 1 mM, and above 5 mM led to drastic cytoplasm reduction, nuclear condensation and death. Ultrastructural assays showed that epimastigotes treated with 1 mM of the compounds retained main parasite organelles such as the Golgi complex and the mitochondria, but underwent drastic reduction in cytoplasm volume and led to the formation of blebs on the plasma membrane, suggesting a cell death process by apoptosis. Infected cultures treated for 24 h with the compounds showed similar effects, with drastic decrease in infection and the elimination of intracellular parasite at 1 mM without toxic effects on the host cells. Intracellular amastigotes showed progressive disorganization leading to the rupture and elimination of the parasite. The results strongly suggest that in presence of thiosemicarbazones and their derivate, intracellular amastigotes arrested the proliferation, leading to irreversible ultrastructural disorganization, death, and then elimination. When the intracellular *T. cruzi* elimination process was analysed, it showed that autophagy was present, in intriguing and new features to futures studies. In addition, our results *in vitro* also suggest that these compounds are promising molecules against intracellular *T. cruzi* when compared to the anti-proliferative drugs Hydroxyurea and Benznidazole.