FLÁVIA SILVA DAMASCENO

Estudo da interferência de fármacos, que atuam via
receptores e/ou transportadores de GABA e Glutamato,
no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

FLÁVIA SILVA DAMASCENO

Estudo da interferência de fármacos, que atuam via
receptores e/ou transportadores de GABA e Glutamato,
no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Damasceno, Flávia Silva.

Estudo da interferência de fármacos, que atuam via receptores e/ou transportadores de GABA e Glutamato, no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* / Flávia Silva Damasceno. – São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Potenciais alvos para a quimioterapia da doença de Chagas.

Versão do título para o inglês: Study of interference of drugs that act via receptors and/or transport of GABA and glutamate in the life cycle of *Trypanosoma cruzi*.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Glutamatérgico 3. GABAérgico
4. Memantina 5. Apoptose 6. Tripanocida I. Silber, Prof. Dr. Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB041/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Silva Damasceno.

Título da Dissertação: Estudo da interferência de fármacos, que atuam via receptores e/ou transportadores de GABA e Glutamato, no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Trabalho realizado com auxílios financeiros concedido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 460/11 referente ao projeto intitulado: "*Estudo da interferência de fármacos que atuam via receptores e/ou transportadores de GABA e Glutamato, no ciclo de vida do Trypanosoma cruzi*" sob a responsabilidade de **Flávia Silva Damasceno**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 29 de junho de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus Pais, Flamarion e Maria Nasaré, pelo
apoio, amor e compreensão incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber pela grande oportunidade que me concedeu, pela orientação, paciência, apoio e amizade. Obrigada por tudo!

À Elizabeth Pral, técnica do laboratório, pelo apoio, amizade, ajuda e todo o suporte técnico.

À minha amiga María Julia Baríson pela amizade, apoio, ajuda nos experimentos e nas discussões dos resultados.

À minha família: meus pais Flamarion e Maria Nasaré; meus irmãos(ãs) Gilberto, Gilmar, Gilson, Gilsa, Gildo, Gildete e Jacó; meus sobrinhos(as) Mariane, Mateus, Gisely, Cecília, Natália, Isabele, Lavínia Maria e Venâncio pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos.

À minha amiga Valnia Pita por me fazer acreditar que era possível a realização desse sonho e pelo apoio e estímulo nessa caminhada.

Aos meus amigos(as) do laboratório: Raíssa Melo, Marcell Crispim, Sandra Carla, Higo Fernando, Inga Eva, Jean Douglas, Carolina Manchola, Ludmila Nakamura, Brian Suarez, Rossana Duque e Letícia Marchese, pelo apoio, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Carsten Wrenger e seu grupo: Flávia Zimbres, Kamila Meissner, Jasmin Lindner, Thales Kronenberger.

A Dra. Lisvane Paes pelo apoio, amizade e colaboração nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Meyer-Fernandes (UFRJ) e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade e ajuda em alguns experimentos.

À Profa. Dra. Alicia J. Kowaltowski do Instituto de Química e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade do uso de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Gerhard Wunderlich e integrantes do seu laboratório, em especial ao doutorando Wesley Fotoran, pela disponibilidade do uso de equipamentos e ajuda em alguns experimentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro no primeiro ano desse trabalho.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia (ICB-USP) pelo apoio e convivência.

“Nunca deixe que lhe digam
que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem
ou que seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém (...)
Confie em si mesmo...”

Renato Russo e Flávio Venturini; 1987

RESUMO

Damasceno FS. Estudo da interferência de fármacos, que atuam via receptores e/ou transportadores de GABA e Glutamato, no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas em áreas endêmicas do México, América central e do Sul. A quimioterapia disponível atualmente limita-se a dois compostos: Nifurtimox e o Benzonidazol. Ambos os fármacos reduzem os sintomas da doença e a mortalidade das pessoas infectadas, quando utilizadas na fase aguda, mas sua eficácia na fase crônica é controversa. Além do mais apresentam vários efeitos colaterais. O *T. cruzi* é capaz de utilizar carboidratos e aminoácidos como fonte de energia e carbono. O nosso grupo tem estudado o envolvimento do glutamato na resistência do parasita ao estresse térmico, oxidativo e metabólico como também a importância do aminoácido GABA no metabolismo do *T. cruzi*, visto que este também é transportado pelo parasita. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a interferência de fármacos, que atuam via receptores ou transportadores de GABA e glutamato, no ciclo de vida do *T. cruzi*. Os fármacos selecionados foram: Vigabatrina, Pregabalina, MK-801, MTEP e Memantina. Os resultados demonstram que apenas Memantina apresentou um melhor efeito tripanocida. Inibiu a proliferação de formas epimastigotas, interferiu na metaciclogênese, como também afetou o metabolismo energético do parasita com a diminuição dos níveis de ATP, além de desencadear mecanismos que levam a apoptose das formas epimastigotas. Memantina também interferiu no ciclo intracelular do parasita, mais especificamente no estágio amastigota. Interessantemente as fases do ciclo do parasita que são mais afetadas, são as fases que requerem mais energia: estágios replicativos (amastigota e epimastigota), como também os processos de diferenciação e invasão celular. Apesar de apresentar valores de IC₅₀ que podem ser considerados altos em relação aos valores descritos para formas epimastigotas tratadas com Benzonidazol, esses resultados mostram perspectivas promissoras, visto que o Memantina poderá ser utilizado como composto líder para o desenho de derivados com atividade tripanocida otimizada.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Memantina. Receptor de glutamato.

ABSTRACT

Damasceno FS. Study of interference of drugs that act via receptors and/or transport of GABA and glutamate in the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. [Masters thesis (Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects approximately 10 million people in endemic areas of Mexico, Central America and South America, with about 25 million people living in areas at risk of infection. The currently available chemotherapy is limited to two compounds, which are: Nifurtimox and Benznidazole. Both drugs reduce symptoms of the disease and mortality of infected people when used in the acute phase, but its efficacy in chronic phase (phase in which the majority of cases are diagnosed) is still controversial. Moreover these drugs have several side effects. *T. cruzi* is able to utilize carbohydrate and amino acids as carbon and energy source. Our group has studied the involvement of glutamate in parasite resistance to thermal, oxidative and metabolic stress, as well as the importance of the amino acid GABA metabolism in *T. cruzi*. The aim of this study was to evaluate the interference of drugs, that act in GABA and glutamate transporters or receptors, in the life cycle of *T. cruzi*. The drugs selected were: vigabatrin, pregabalin, MK-801, memantine and MTEP. The results showed that only memantine has a better trypanocidal effect. Memantine inhibited the proliferation of epimastigotes, interfered in metacyclogenesis, and affected the energy metabolism of the parasite with decreased levels of ATP, and trigger mechanisms that lead to apoptosis of epimastigotes. Moreover interferes with intracellular cycle of the parasite, specifically in amastigote stage. Interesting that stages of the parasite that require more energy are more affected: replicative stages (epimastigote and amastigote) as well as the processes of differentiation and cell invasion. IC₅₀ value is more than that described to epimastigotes treated with Benznidazole, but Memantine could be used as leader compound for the design of drugs with optimized trypanocidal activity.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Memantine. Glutamate receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 2 - Estruturas químicas do Benzonidazol e Nifurtimox	24
Figura 3 - Estruturas químicas dos fármacos com ação GABAérgica	28
Figura 4 - Estruturas químicas dos fármacos com ação glutamatérgica	29
Figura 5 - Curvas de crescimento de <i>T. cruzi</i>, estágio epimastigota, tratados com os fármacos de interesse.....	40
Figura 6 - Curvas dose-resposta do <i>T. cruzi</i>, estágio epimastigota, para os tratamentos com MK-801 ou Memantina	41
Figura 7 - Curvas de crescimento do <i>T. cruzi</i>, estágio epimastigota, submetidos ao estresse térmico e oxidativo e tratados com MK-801 ou Memantina	42
Figura 8 - Curvas dose-resposta do crescimento de <i>T. cruzi</i>, estágio epimastigota, submetidos ao estresse térmico ou oxidativo.....	44
Figura 9 - Resposta do <i>T. cruzi</i>, estágio epimastigota, ao estresse nutricional na presença do Memantina	45
Figura 10 - Efeito da Memantina na metaciclogênese	46
Figura 11 - Representação da análise por citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular	48
Figura 12 - Representação gráfica da quantificação de H₂O₂.....	49
Figura 13 - Representação gráfica da concentração intracelular de Ca²⁺	50
Figura 14 - Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	51
Figura 15 - Efeito da Memantina no ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>.....	53
Figura 16 - Curvas dose-resposta da toxicidade em células CHO-K₁, infectividade de formas tripomastigotas e tratamento da infecção após a invasão celular	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CHO-K₁	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (linhagem celular proveniente de ovário de hamster chinês)
Ca²⁺	Cálcio
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
DTUs	<i>Discrete Typing Units</i>
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis-aminoetiletertracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Aminoácido γ -aminobutírico
GABA T	Aminoácido γ -aminobutírico transaminase
GAPDH	Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IC₅₀	Metade da concentração máxima inibitória
KCl	Cloreto de potássio
LIT	<i>Liver Infusion-Tryptose</i> (Meio de cultura)
MCP	Morte celular programada
mg	Miligramas
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromo tetrazolio)
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio monobásico anidro
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NCCD	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i> (Comite de Nomeclatura de Morte Celular)
NH₄⁺	Ion amônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
•OH	Radical hidroxila
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Sódio dodecil sulfat
SFB	Soro fetal bovino
U	Unidades
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais da doença de chagas	16
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e o metabolismo de aminoácidos	20
1.4 Morte celular em <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	21
1.5 Terapia na doença de Chagas.....	23
1.6 Perspectivas de novos fármacos	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Microorganismos utilizados no trabalho.....	31
3.1.1 <i>Células hospedeiras</i>	31
3.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.2 Manutenção das células hospedeiras	31
3.3 Obtenção dos parasitas	31
3.3.1 <i>Epimastigotas</i>.....	31
3.3.2 <i>Curvas de crescimento de epimastigotas de T. cruzi</i>	31
3.3.3 <i>Formas tripomastigotas</i>.....	32
3.4 Resistência a diferentes tipos de estresse	32
3.4.1 <i>Ensaio de estresse térmico em formas epimastigotas</i>.....	32
3.4.2 <i>Avaliação da interação dos fármacos com o estresse metabólico</i>.....	33
3.4.2.1 <i>Avaliação dos níveis de ATP intracelular</i>	33
3.4.3 <i>Ensaio de estresse oxidativo em formas epimastigotas</i>	33
3.5 Tipo de morte celular em parasitas tratados com Memantina	34
3.5.1 <i>Avaliação da exposição de fosfatidilserina na membrana do parasita</i>	34
3.5.2 <i>Ensaio para quantificação de Ca^{2+} intracelular em formas epimastigotas</i>	35
3.5.3 <i>Ensaio para verificação da geração de espécies reativas de oxigênio</i>.....	35
3.6 Efeito sobre a metaciclogênese	35
3.7 Análise do efeito dos compostos no ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	36
3.7.1 <i>Toxicidade dos fármacos em células de mamíferos</i>	36

3.7.2 Análise do efeito dos compostos na infectividade das formas tripomastigotas	36
3.7.3 Análise do efeito dos compostos após a invasão celular pelas formas tripomastigotas	37
3.7.4 Avaliação da fase intracelular mais susceptível ao tratamento com os compostos.....	37
3.8 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Curvas de crescimento do <i>T. cruzi</i> na presença dos compostos	39
4.2 Interação com condições de estresse	41
4.3 Efeito da Memantina na metaciclogênese	46
4.4 Tipo de morte celular sofrida pelo parasita tratado com Memantina.....	47
4.5 Efeito da Memantina no ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença de chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909). Esta doença é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas em áreas endêmicas do México, América Central e do Sul, com cerca de 25 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção. Ocorrem por ano aproximadamente 40 mil novos casos e 12 mil mortes, devido a complicações cardíacas e digestivas (World Health Organization, 2012). Programas de controle do vetor desenvolvidos nos últimos 20 anos, como também um maior controle nos bancos de sangue tem reduzido o número de novos casos da doença de Chagas na América Latina (Rassi, Marin-Neto, 2010). Devido as intensas migrações de pessoas de países endêmicos, o número de casos de indivíduos infectados tem aumentado em áreas consideradas não endêmicas, tais como Estados Unidos, Canadá e algumas regiões da Europa (Bern et al., 2009; Maguire, 2006; Schmunis, 2007). A doença é uma zoonose que tem como reservatório natural do *T. cruzi* uma ampla variedade de mamíferos do continente americano (Urbina, Docampo, 2003). É transmitida para os seres humanos e para mais de 150 espécies de animais domésticos e animais selvagens, principalmente por insetos hematófagos da família Reduviidae. Apesar de existirem mais de 130 espécies de triatomíneos, são três as mais importantes na transmissão do *T. cruzi* para o homem: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Rassi, Marin-Neto, 2010). O parasita também pode ser transmitido por transfusão de sangue, congenitamente (de mães infectadas para recém-nascidos), por transplante de órgãos ou medula óssea. Também pode ocorrer por acidentes em laboratórios que trabalham com o parasita vivo, via esta que epidemiologicamente é pouco relevante. Outra forma de transmissão é por via oral através de alimentos contaminados, essa via vêm sendo considerada como relevante na manutenção do ciclo de transmissão natural (Pereira et al., 2009; Rassi, Marin-Neto, 2010).

A evolução clínica da doença de Chagas pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda normalmente é assintomática ou apresenta sintomatologia discreta, que na maioria dos casos passa despercebida pelo paciente. Os sintomas, quando aparecem, o fazem uma ou duas semanas após a exposição ao triatomíneo infectado ou poucos meses após a transfusão com sangue contaminado (Rassi, Marin-Neto, 2010). Os sintomas mais frequentemente apresentados pelos pacientes agudos são: febre prolongada, mal-estar,

distensão do fígado, baço e linfonodos. Pode haver também edema subcutâneo localizado ou generalizado. No caso particular de transmissão vetorial o paciente pode apresentar um sinal da porta de entrada do *T. cruzi* na pele (chagoma) ou via mucosa ocular (sinal de Romana). As manifestações da fase aguda se resolvem espontaneamente em aproximadamente 90% dos indivíduos infectados, mesmo sem o tratamento com drogas tripanocidas. Essa fase é caracterizada pela alta parasitemia e ausência de anticorpos específicos. Nessa fase os parasitas podem ser encontrados em praticamente todos os tecidos, estando majoritariamente presentes no sangue. Por ser uma fase de curta duração sem sintomatologia aparente ou com sintomatologia pouco definida, há um pequeno número de casos detectados, sendo portanto, a fase menos estudada (Rassi, Marin-Neto, 2010; Silber et al., 2005b).

Logo após a fase aguda tem início a fase crônica, caracterizada pelos altos títulos de anticorpos no sangue do paciente e pelo fato de que a parasitemia é inaparente. O paciente pode permanecer por vários anos, ou até mesmo pelo resto da vida, sem apresentar sinais ou sintomas. Essa forma da fase crônica é chamada de indeterminada. Aproximadamente 30-40% dos pacientes crônicos indeterminados desenvolvem a sintomatologia característica da doença, evoluindo para a chamada fase crônica sintomática. Nesta fase, as três principais formas são a cardíaca, a digestiva e a cardiodigestiva (Acquatella, 2007; Marin-Neto et al., 1999). Na forma cardíaca, o coração é um dos primeiros órgãos afetados, não necessariamente o único, desenvolvendo hipertrofia e dilatação. Na forma digestiva, o trato digestivo apresenta alterações anatômicas e fisiológicas importantes, sendo a principal alteração a dilatação do intestino e do esôfago, que podem apresentar aspecto de megaviscera (Marin-Neto et al., 1999; Rassi et al., 2000), revisado por (Boscardin et al., 2009; Rassi, Marin-Neto, 2010).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um parasita intracelular obrigatório, classicamente localizado na ordem kinetoplastida, gênero *Trypanosoma*, que causa uma infecção crônica em humanos e em grande número de outras espécies de mamíferos (Hoare, 1972). Recentemente, devido à alta variabilidade biológica, bioquímica e molecular, a espécie *Trypanosoma cruzi* foi dividida em seis linhagens subspecíficas (*Discrete Typing Units – DTUs*) numerados de I a VI. Esta classificação foi realizada com base em características genéticas, moleculares e imunológicas, com o objetivo de unificar a nomenclatura e facilitar a comunicação dentro da comunidade científica (Zingales et al., 2009).

O *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo, que alterna entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero. O parasita apresenta diferentes formas correspondentes a diferentes estágios do seu ciclo de vida. Estes diferentes estágios têm sido descritos com base em critérios morfológicos como a forma fusiforme ou arredondados, a região onde emerge o flagelo e a posição do cinetoplasto (estrutura contendo o DNA da única mitocôndria presente no parasita) em relação ao núcleo. No hospedeiro mamífero foram descritas as formas amastigota, epimastigota intracelular e tripomastigota sanguícola. A forma amastigota é um estágio replicativo e infectivo. São células arredondadas, medindo de 2-6 µm de diâmetro, encontradas no citoplasma das células infectadas. Os epimastigotas intracelulares (*epimastigote-like*) são formas replicativas intermediárias entre amastigotas e tripomastigotas, também encontrados dentro das células, medindo aproximadamente 5,4 µm. Essas formas são menores que as formas epimastigotas encontradas no inseto vetor, porém compartilha com as mesmas, padrões morfométricos e diversas características bioquímicas e biológicas (Almeida-De-Faria et al., 1999). O tripomastigota sanguícola é um estágio flagelado, infectivo, não replicativo, encontrado principalmente na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. Mede aproximadamente 18 µm de comprimento, incluindo um extremo livre do flagelo de aproximadamente 6 µm, e 2-3 µm de largura.

No inseto vetor encontram-se predominantemente as formas epimastigota e tripomastigota metacíclico. Epimastigota é uma forma flagelada, replicativa e não infectiva. Mede aproximadamente 20-40 µm de comprimento e 2-5 µm de largura, essas formas estão presentes tipicamente na porção média do intestino do hospedeiro invertebrado. Tripomastigota metacíclico é uma forma infectiva não replicativa encontrada na porção final do intestino do inseto vetor (Brener, 1971), revisado por (Silber et al., 2005a; Tyler, Engman, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia-se quando os parasitas, presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado infectado, passam ao inseto vetor durante o repasto sanguíneo. No intestino do inseto, estas formas se diferenciam em formas epimastigotas (De Souza et al., 2002), que após multiplicação por fissão binária colonizam a porção terminal do intestino e se diferenciam novamente em tripomastigotas metacíclicos. Quando o inseto infectado pica o hospedeiro vertebrado e inicia o repasto sanguíneo, concomitantemente elimina as formas tripomastigotas metacíclicos junto com as fezes e urina. Uma vez em contato com a pele ou mucosas do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas são internalizados através de pequenas lesões na pele, causadas pelo próprio hospedeiro (Alves, Colli, 2008). Os tripomastigotas invadem as células do hospedeiro mamífero e se diferenciam em formas replicativas denominadas amastigotas, estabelecendo assim a infecção. Após aproximadamente 96 horas, os amastigotas começam a se diferenciar em tripomastigotas, passando pela forma intermediária epimastigota intracelular. Estas formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea podendo invadir novas células ou serem ingeridas pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo, fechando assim o seu ciclo de vida. O esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* está representado na **Figura 1**.

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

1.3 *Trypanosoma cruzi* e o metabolismo de aminoácidos

T. cruzi é capaz de utilizar carboidratos e aminoácidos como fonte de energia e carbono. As formas epimastigotas, preferencialmente, catabolizam glicose e após a exaustão do carboidrato, ocorre uma mudança para o metabolismo de aminoácidos. A prolina e a glutamina são os principais aminoácidos metabolizados pelas formas epimastigotas, visto que são abundantes na hemolinfa e nos fluídos dos tecidos do inseto vetor. Esse metabolismo ocorre com produção de NH_4^+ (produto da deaminação dos aminoácidos) que é excretada para o meio extracelular (Bringaud et al., 2006; Cazzulo, 1994). As formas tripomastigotas utilizam principalmente a glicose, que é abundante nos fluídos de seus hospedeiros vertebrados. Já as formas amastigotas, encontradas no citoplasma das células do hospedeiro mamífero, ambiente pobre em glicose livre, usam os aminoácidos como principal fonte de carbono e energia, apresentando maior quantidade de prolina intracelular do que as formas tripomastigotas (Silber et al., 2009).

Entre os aminoácidos metabolizados pelas formas epimastigotas estão prolina, glicina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, leucina e isoleucina (Mancilla et al., 1967; O'daly et al., 1983; Silber et al., 2005a; Sylvester, Krassner, 1976; Zeledon, 1960). Os aminoácidos estão envolvidos também em outros processos importantes do ciclo de vida do *T. cruzi*. O aminoácido L-prolina é essencial na diferenciação das formas epimastigota intracelular para tripomastigotas, além de estarem envolvidos nos processos de osmorregulação, crescimento e resistência do parasita ao estresse oxidativo e nutricional (Homsy et al., 1989; Magdaleno et al., 2009; Magdaleno et al., 2011; Pereira et al., 2002; Pereira et al., 2003; Tonelli et al., 2004). Glutamato, prolina e aspartato são importantes na metaciclogênese, ou seja, na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Contreras et al., 1985). Prolina, glicina, alanina e glutamato são descritos como importantes nos processos de osmorregulação e controle do volume celular (Rohloff et al., 2003; Rohloff et al., 2004a).

Os aminoácidos, para que sejam metabolizados ou cumprirem outras funções, devem ser obtidos a partir da degradação de proteínas, sintetizados ou incorporados pelo parasita através de transportadores localizados na membrana (Silber et al., 2005a). O primeiro transportador de aminoácidos em *T. cruzi* foi descrito bioquimicamente em 1970: o transportador de lisina (Hampton, 1970). Outros aminoácidos também já tiveram a sua cinética e seu mecanismo de transporte descrito para *T. cruzi*. A incorporação de arginina pelo parasita apresenta pelo menos dois sistemas de transporte, sendo um de alta afinidade e outro de baixa afinidade. Esse transporte é regulado ao longo do ciclo de vida do parasita

(Canepa et al., 2004; Pereira et al., 1999). A prolina também é incorporada através de dois sistemas de transporte. O sistema “A”, de alta afinidade é dependente do gradiente de H^+ , e o sistema “B”, de baixa afinidade é dependente de ATP (Silber et al., 2002). Já o transporte de glutamato ocorre através do gradiente de H^+ na membrana do parasita, mas não é dependente da concentração de sódio ou potássio (Silber et al., 2006). Recentemente o nosso grupo descreveu uma atividade de transporte do ácido gamma-aminobutírico (GABA) em *T. cruzi*, aminoácido que, além de ser um conhecido neurotransmissor é um análogo estrutural do glutamato (Rojas, 2007). A existência de um transportador de GABA pode indicar a participação deste aminoácido em processos biológicos e no metabolismo do *T. cruzi*.

A caracterização molecular e bioquímica de vias metabólicas e transportadores de aminoácidos em tripanossomatídeos são de grande importância, pois tem revelado uma variedade de rotas que permitem a síntese *de novo* de compostos cruciais para a sua sobrevivência. Ou também a sua incorporação e aproveitamento a partir de compostos sintetizados pelos organismos hospedeiros. O estudo de diferentes vias metabólicas de aminoácidos também permite obter informações relevantes sobre a importância de cada um desses metabólitos para a biologia do parasita. Desta forma tem se identificado enzimas e transportadores que podem ser alvos interessantes para a busca de novas drogas para novos tratamentos contra a doença de Chagas.

1.4 Morte celular em *Trypanosoma cruzi*

O termo morte celular programada (MCP) foi introduzido em 1964 por Lockshin e Williams (Lockshin, 1964). Esse termo descreve eventos que de forma orquestrada e bem definida em etapas controladas, e não acidentalmente, levam a morte celular (Duszenko et al., 2006). Durante muito tempo acreditou-se que esse processo ocorria somente em organismos multicelulares com o objetivo de evitar malformações na embriogênese, evitar doenças autoimunes durante a diferenciação linfocitária ou para manter a integridade dos tecidos e evitar o câncer.

O Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death – NCCD*) define os diferentes tipos de morte celular baseados em seus mecanismos (Kroemer et al., 2005). Os três principais tipos são: apoptose, necrose e autofagia:

- Apoptose: é caracterizada pelo arredondamento da célula, retração de pseudópodes, redução do volume celular, ativação das caspases, condensação da cromatina, fragmentação

do núcleo, manutenção da integridade da membrana celular até os últimos estágios do processo.

- Autofagia: é o tipo de morte celular que ocorre sem condensação da cromatina, acompanhada por vacuolização autofágica do citoplasma. Esses vacúolos apresentam dupla membrana e contém organelas citoplasmáticas em processo de degeneração, o que permite que sejam distinguidas de outras vesículas, como endossomos e lisossomos, por microscopia eletrônica.

- Necrose: é considerada um tipo de morte celular que não apresenta sinais de apoptose ou autofagia. Caracteriza-se principalmente por ruptura da membrana celular e dilatação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Kroemer et al., 2005).

Mais recentemente foram relatadas várias evidências de MCP em eucariotos unicelulares, incluindo tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (Debrabant et al., 2003). Várias características de MCP encontradas em organismos multicelulares têm sido relatadas para tripanossomatídeos. Estas características incluem despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C, ativação de proteases, exposição de fosfatidilserina, encolhimento ou arredondamento das células, manutenção da integridade da membrana e fragmentação de DNA (Debrabant et al., 2003; Duszenko et al., 2006; Kaczanowski et al., 2011). Também foi observado que o uso de inibidores de caspases bloqueia algumas características associadas com MCP em tripanossomatídeos (Irigoin et al., 2009).

Um estudo realizado por Ameisen e colaboradores demonstrou que formas epimastigotas cultivadas por mais de uma semana no mesmo meio se diferenciavam para metacíclicos ou morriam apresentando características de apoptose (Ameisen et al., 1995). Muitas proteínas descritas como participantes da apoptose em metazoários não estão presentes em tripanossomatídeos. Há evidências de que metacaspases, um grupo de proteases com estrutura similar às caspases, mas com diferentes atividades enzimáticas, podem estar envolvidas no processo de apoptose desses organismos (Smirlis, Soteriadou, 2011). Essas proteínas estão envolvidas em fases importantes do ciclo de vida do parasita, como progressão do ciclo celular, proteção para que formas epimastigotas não sofram morte celular e diferenciem para tripomastigota metacíclico (Laverriere et al., 2012). O fato de que as metacaspases não estão presentes em humanos e desempenham um importante papel em tripanossomatídeos, faz com que apresentem perspectivas promissoras como potenciais alvos terapêuticos (Berg et al., 2010). Alguns autores têm descrito a participação da mitocôndria no

processo de apoptose em *T. cruzi*. Como acontece em metazoários, a mitocôndria é a principal organela envolvida nesse processo. Mudanças na função mitocondrial, principalmente quando ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram identificadas como o principal evento de sinalização e execução desse processo (Irigoín et al., 2009; Menna-Barreto et al., 2009; Smirlis, Soteriadou, 2011). A produção de EROs e a desregulação da homeostase de Ca^{2+} pode contribuir para a apoptose nessas células (Smirlis, Soteriadou, 2011). Os motivos pelos quais os tripanossomatídeos sofrem MCP ainda não estão bem esclarecidos, mas alguns autores sugerem que, apesar das células viverem de forma independente, competem por nutrientes e fatores de crescimento. Este seria um mecanismo de sobrevivência relacionado com a regulação da proliferação celular, além da manutenção de uma infecção controlada e persistente, afetando a resposta imunológica do hospedeiro. Este mecanismo também poderia estar envolvido no controle da população de parasitas no hospedeiro, aumentando a sobrevivência do mesmo e favorecendo a sua transmissão para o próximo hospedeiro (Debrabant et al., 2003; Duszenko et al., 2006).

1.5 Terapia na doença de Chagas

Nas últimas décadas muitas medidas foram colocadas em prática visando o controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. Apesar de terem sido bem sucedidas, os resultados dessas medidas não beneficiam diretamente os milhões de indivíduos já infectados, tão pouco os pacientes chagásicos com manifestações clínicas da doença (Coura et al., 2002). Embora a doença tenha mais de um século da sua descoberta, a quimioterapia disponível atualmente limita-se a dois compostos que começaram a ser utilizados em humanos na década de 1970, que são: Nifurtimox [3-methyl-4(5'-nitrofurfurylideneamine) tetrahydro-4H-tiazine-1,1-dioxide] fabricado pela Bayer com o nome comercial de Lampit[®] e o Benzonidazol (N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide) fabricado pela Roche com o nome comercial de Rochagan[®] (Dias et al., 2009; Senkovich et al., 2005). As estruturas químicas desses compostos estão representadas na **Figura 2**:

Figura 2 – Estruturas químicas do Benzonidazol e Nifurtimox.

(1) Benzonidazol e (2) Nifurtimox

A dose recomendada na fase aguda é de 8-10 mg/kg/dia de Nifurtimox ou 5 mg/kg/dia de Benzonidazol. A média do tempo de tratamento é de 60 dias, mas quando há uma reativação da fase crônica, em pacientes imunocomprometidos por exemplo, o tratamento pode durar cinco meses ou mais. Em casos da possibilidade de infecção, como no caso de transfusão com sangue supostamente contaminado ou acidentes em laboratórios, é feito um tratamento profilático com duração de dez dias (Maya et al., 2007; Rassi, Marin-Neto, 2010). O mecanismo de ação de ambos os compostos ainda não está bem claro, mas acredita-se que ocorra por meio da formação de radicais livres como também pela formação de metabólitos eletrofílicos.

Ao radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), resultante do metabolismo desses fármacos, é atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação com lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*. Os metabólitos eletrofílicos formados pelo mecanismo de ação de ambos os compostos podem atuar também em outros sistemas, especialmente do hospedeiro humano, devido a sua alta reatividade (Dias et al., 2009; Docampo, 1990; Maya et al., 2007; Urbina, 2002).

Ambas as drogas reduzem os sintomas da doença e a mortalidade das pessoas infectadas, quando utilizadas na fase aguda (Cancado, 1999), mas sua eficácia varia de acordo com a duração do tratamento, como também com a idade e distribuição geográfica dos pacientes, provavelmente devido à susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* ao tratamento (Dias et al., 2009; Filardi, Brener, 1987). É importante ressaltar que vários estudos sugerem o tratamento com Benzonidazol de pacientes com a forma crônica da doença de Chagas. Porém, nesta fase (em que a maioria dos casos são diagnosticados) a eficácia deste tratamento é controversa (Boscardin et al., 2009; Silber et al., 2005b). Além do mais

apresentam vários efeitos colaterais, como por exemplo: anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central, parestesia, dermatite, entre outros sintomas e requerem longo tempo de tratamento que pode durar até 90 dias (Maya et al., 2007; Urbina, Docampo, 2003). Esse longo período pode levar ao abandono do tratamento pelos pacientes, o que resulta na seleção (dentro da população tratada) de parasitas mais resistentes.

O Benzonidazol, o único tripanocida disponível no mercado brasileiro atualmente, é indicado nas seguintes situações: infecção na fase aguda, reativação da infecção por drogas imunossupressoras, infecções adquiridas recentemente e para pacientes com órgãos transplantados procedentes de pacientes chagásicos (Silber et al., 2005b).

1.6 Perspectivas de novos fármacos

É urgente a necessidade do desenvolvimento de drogas mais potentes e seguras para o tratamento específico da doença de Chagas (Urbina, Docampo, 2003). As pesquisas por novos fármacos com atividade tripanocida têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas, principalmente após o sequenciamento dos genomas do *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* (Moreira et al., 2009). Mesmo assim ainda não foi desenvolvido um fármaco seguro e eficaz contra esses parasitas. Atualmente alguns alvos macromoleculares, com funções biológicas importantes para a viabilidade do *T. cruzi*, têm sido explorados para o desenvolvimento de novos fármacos.

Entre eles estão:

Via glicolítica:

As formas infectivas do parasita utilizam preferencialmente a glicose como fonte de carbono e energia. Esta via é importante para geração de energia através da produção de ATP. Três enzimas dessa via têm sido bastante exploradas como alvos biológicos: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, EC1.2.1.12), a hexoquinase (EC 2.7.1.11) e a fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.1) (Dias et al., 2009). Contudo há indícios de que essa via não está ativa no estágio intracelular amastigota (Silber et al., 2009), o que limitaria a utilização desses alvos.

Metabolismo dependente de grupos tióis:

O *T. cruzi* não apresenta as vias clássicas descritas para defesa contra o estresse oxidativo, já que nenhuma catalase ou glutationala peroxidase é encontrada no parasita e a atividade da superóxido dismutase é reduzida (Maya et al., 2003). Desta forma o principal mecanismo de defesa envolve os tióis: tripanotiona, homotripanotiona, glutationala e ovotiol. Uma redução nos níveis dos tióis antioxidantes tornaria o parasita altamente vulnerável aos efeitos de radicais livres. As enzimas que se destacam na via de biossíntese de tióis são: tripanotiona redutase (EC 1.8.1.12) e tripanotiona sintase (EC 3.6.1.9). A primeira é responsável pela manutenção dos níveis de tripanotiona reduzida e a segunda pela adição do composto glutationala ao substrato glutationalil espermidina, formando tripanotiona. A enzima triparedoxina peroxidase também apresenta importância considerável na exposição do *T. cruzi* às espécies reativas de oxigênio (Dias et al., 2009; Urbina, 2002; Wilkinson 2003).

Biossíntese de esteróis:

Os esteróis são componentes essenciais às membranas das células. Em organismos unicelulares os esteróis são essenciais ao crescimento celular. *T. cruzi* não sintetiza colesterol, sintetizando portanto o ergosterol (Urbina et al., 1995), o qual é importante na proliferação e viabilidade celular (Maya et al., 2007). Essa via tem sido um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos. Inibidores de biossíntese de esteróis são os únicos que alcançaram triagens clínicas avançadas como candidatos a fármacos anti- *T. cruzi* (Urbina, 2010). Dentre os inibidores mais representativos estão os derivados azólicos inibidores da esterol 14-demetilase, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, além do *tipifarnib* que é um inibidor da farnesiltransferase (Dias et al., 2009).

Proteases:

Em *T. cruzi* as proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasita do sistema imune do hospedeiro. A cruzipaina (gp51/57) é responsável pela principal atividade proteolítica em todos os estágios do ciclo de vida desse parasita (Urbina, 2002). Dada a sua importância algumas proteases têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos. Serinoproteases,

metaloproteases, cisteínoproteases e treoninoproteases são exemplos de proteases amplamente estudadas (Duschak, Couto, 2007; Soeiro, De Castro, 2009).

Vias metabólicas de aminoácidos:

O estudo das vias metabólicas dos aminoácidos em tripanosomatídeos também tem revelado uma variedade de compostos cruciais para a sobrevivência do *T. cruzi*. Assim, transportadores e enzimas relacionados ao seu metabolismo podem ser alvos interessantes para o desenho de novos fármacos. Já foi descrito a importância de muitos aminoácidos no ciclo de vida do *T. cruzi*. Como exemplo, o glutamato está envolvido em processos importantes como metaciclogênese, osmorregulação e controle do volume celular (Contreras et al., 1985; Rohloff et al., 2003; Rohloff et al., 2004b).

O nosso grupo tem estudado o envolvimento do glutamato na resistência do parasita ao estresse térmico, oxidativo e metabólico (Magdaleno et al., 2011), como também iniciamos estudos sobre a importância do aminoácido GABA no metabolismo do *T. cruzi*, visto que, este também é transportado pelo parasita (Rojas, 2007). Esses metabólitos são relatados na literatura neurobiológica como os principais neurotransmissores excitatório e inibitório, respectivamente, em mamíferos.

Diante do exposto, foi considerado relevante o estudo da possível atividade anti-*T. cruzi*, de compostos com atuação nas vias glutamatérgica e GABAérgica do sistema nervoso central, já disponíveis para uso em seres humanos, com o intuito de aproveitar o conhecimento da sua farmacocinética, biodisponibilidade, toxicidade, efeitos secundários dentre outros parâmetros. Existem no mercado alguns fármacos que atuam via receptores ou transportadores de GABA e glutamato e que são utilizados amplamente para o tratamento clínico de várias patologias de acometimento do sistema nervoso central. Para este estudo foram selecionados inicialmente dois fármacos com ação sobre a via GABAérgica, cujas estruturas químicas estão representadas na **Figura 3** e estão descritos a seguir:

Figura 3 - Estruturas químicas dos fármacos com ação GABAérgica.

(1) Vigabatrina e (2) Pregabalina

A Vigabatrina é um inibidor irreversível do receptor GABA Transaminase (GABA T). Esta inibição foi demonstrada em um estudo realizado *in vitro* com neurônios e células da glia (Gran, Borchgrevink, 1989). A ligação da Vigabatrina ao receptor é irreversível, só uma nova síntese da enzima pode restabelecer a atividade de GABA T, podendo também bloquear o transporte de GABA (Jung et al., 1977).

Pregabalina é um análogo de GABA com uma substituição na posição C-3 (Gajcy et al., 2010), atua ligando-se a subunidade $\alpha 2\text{-}\delta$ do canal de Ca^{2+} controlado por voltagem. A potente inibição desse sítio reduz o influxo de Ca^{2+} para os terminais nervosos pré-sinápticos, reduzindo assim a liberação de alguns neurotransmissores, como glutamato e noradrenalina (Ha et al., 2008).

Também foram selecionados três fármacos que atuam via receptores de glutamato, cujas estruturas químicas estão representadas na **Figura 4** e estão descritos a seguir:

Figura 4 - Estruturas químicas dos fármacos com ação glutamatérgica.

(1) MK-801, (2) (MTEP) e (3) Memantina

O MK-801 é um antagonista do receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (Liu et al., 2009). Atua ligando-se no receptor impedindo o fluxo de íons tais como Ca^{2+} (Coan et al., 1987). O MTEP 3-((2-Metil-4-thiazolil) etinil)piridina, atua como um antagonista seletivo não competitivo do receptor metabotrópico de glutamato mGluR5 (Iso et al., 2006). Uma caracterização, *in vivo* e *in vitro*, indicou que o MTEP é altamente seletivo para mGluR5 e não tem efeito significativo em outros subtipos mGluR. Já a Memantina é uma amina tricíclica, a primeira da classe de novos medicamentos para a doença de Alzheimer, atuando no sistema glutamatérgico com o bloqueio da atividade de receptores de glutamato do tipo NMDA (Lipton, 2005). Estes fármacos, tanto os de ação GABAérgica quanto os de ação glutamatérgica, já são utilizados em seres humanos. Apresentam efeitos terapêuticos benéficos em várias desordens neurológicas agudas e crônicas, como anticonvulsivantes e até mesmo no tratamento da esquizofrenia. Portanto, são fármacos já aprovados para uso em seres humanos, com efeitos colaterais e toxicidade conhecidos, como também a farmacocinética e farmacodinâmica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar as possíveis interferências de fármacos que atuam via receptores ou transportadores de GABA e glutamato, no ciclo de vida do *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito dos fármacos selecionados sobre as curvas de crescimento da forma epimastigota e sobre a diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas (metaciclogênese).
- ✓ Avaliar a resistência da forma epimastigota a diferentes tipos de estresse (metabólico, térmico e oxidativo) na presença dos fármacos em estudo.
- ✓ Comparar os efeitos inibitórios desses fármacos na progressão do ciclo de vida nos diferentes estágios parasitários, com ênfase nos estágios correspondentes ao ciclo de infecção em mamíferos (amastigotas, epimastigotas intracelular e tripomastigotas).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microorganismos utilizados no trabalho

3.1.1 Células hospedeiras

Células da linhagem CHO-K₁ (*Chinese Hamster Ovary*).

3.1.2 *Trypanosoma cruzi*

Cepa CL, clone 14 (Brener, Chiari, 1963).

3.2 Manutenção das células hospedeiras

Células da linhagem CHO-K₁ (*Chinese Hamster Ovary*) foram cultivadas a 37 °C em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), acrescido com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 0,15% (m/v) de NaHCO₃, sob atmosfera úmida a 5% de CO₂ (Tonelli et al., 2004).

3.3 Obtenção dos parasitas

3.3.1 *Epimastigotas*

As formas epimastigotas extracelulares foram mantidas em fase exponencial de crescimento por passagens sucessivas (cada 48 horas) em meio LIT (*Liver Infusion-Tryptose*) que contém infusão de fígado 5,0 g/L, Triptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCL 0,4 g/L, Na₂HPO₄ 8,0 g/L, glicose 2 g/L, hemina 10 g/L suplementado com 10% de SBF, pH 7,2; a 28 °C (Camargo, 1964).

3.3.2 *Curvas de crescimento de epimastigotas de T. cruzi*

Foram utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial (5.0 a 6.0×10^7 células mL⁻¹). As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos ou não (controle negativo). Como controle positivo de inibição foi utilizado uma combinação de Rotenona (60 µM) e Antimicina (0,5 µM). As células ($2,5 \times 10^6$ células mL⁻¹)

foram transferidas para placas de cultura de 96 poços (200 µl/poço). A placa foi mantida na estufa a 28 °C. A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em λ 620 nm durante 8 dias. A absorbância foi transformada em valores de densidade celular (células/mL) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. A concentração do fármaco que inibiu 50% da proliferação dos parasitas (IC₅₀) foi determinada na fase exponencial de crescimento (quinto dia) mediante ajuste dos dados na curva dose-resposta com a equação clássica sigmóide (Magdaleno et al., 2009). Cada composto foi avaliado em quadruplicata em cada experimento, sendo que os resultados apresentados correspondem a três experimentos independentes.

3.3.3 Formas tripomastigotas

As células CHO-K₁ foram infectadas com 3.0×10^7 tripomastigotas por garrafa (75 cm²) em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Os parasitas ficaram em contato com as células durante 4 horas, mantidas a 37 °C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂, como descrito por (Tonelli et al., 2004). Após esse período as células foram lavadas duas vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e acrescidas de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e incubadas a 37 °C. Após 12 horas as células foram lavadas com PBS, acrescidas de meio RPMI 1640 (2% SFB) e incubadas a 33 °C. Os parasitas foram coletados no quinto, sexto e sétimo dia pós-infecção, contados na câmara de Neubauer e utilizados em experimentos posteriores.

3.4 Resistência a diferentes tipos de estresse

3.4.1 Ensaio de estresse térmico em formas epimastigotas

Os ensaios foram realizados conforme descrito na seção 3.3.2, modificando-se apenas a temperatura de incubação. As placas foram mantidas na estufa a 33 °C ou 37 °C (Magdaleno et al., 2009).

3.4.2 Avaliação da interação dos fármacos com o estresse metabólico

Para avaliar a interação entre os fármacos e o estresse metabólico, epimastigotas (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensos em meio LIT ou PBS e tratados ou não (controle negativo) com a concentração correspondente ao seu IC_{50} . As células foram incubadas a 28 °C durante 30 horas e após esse período foi avaliado o nível de ATP intracelular.

3.4.2.1 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

Para avaliar os níveis de ATP intracelular, em formas epimastigotas de *T. cruzi*, utilizamos o kit bioluminescente para células somáticas, comprado da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) conforme instruções do fabricante. Brevemente, 50 μL de PBS foi adicionado a 100 μL do reagente de lise e acrescentou-se 50 μL da suspensão de parasitas contendo 5.0×10^6 células mL^{-1} tratadas ou não (controle). A concentração de ATP foi determinada utilizando-se a curva padrão das diferentes concentrações de ATP. A luminescência foi obtida pela reação entre a luciferase e o ATP que foi liberado após a lise celular, sendo determinada pela utilização do luminômetro *Lumat LB 9507*, utilizando-se um λ 570 nm (Martins et al., 2009).

3.4.3 Ensaio de estresse oxidativo em formas epimastigotas

Inicialmente foi determinado o valor de IC_{50} para H_2O_2 nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, o qual foi utilizado posteriormente para os ensaios de estresse oxidativo. Para isso, as células (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em PBS com diferentes concentrações de H_2O_2 (10 a 100 μM) durante 60, 90 e 120 minutos a 28 °C. Após esse tempo as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio LIT e distribuídas em placa de 96 poços. A placa foi mantida na estufa a 28 °C. A proliferação celular foi estimada por leitura da DO a λ 620 nm a cada 24 horas durante 6 dias. A DO foi transformada em valores de densidade celular (células/mL) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. A concentração de H_2O_2 correspondente ao valor do IC_{50} , foi determinada na fase exponencial de crescimento (quinto dia) mediante ajuste dos dados da curva dose-resposta com a equação clássica sigmóide.

Para avaliar uma possível interação entre os fármacos e o estresse oxidativo, os parasitas foram lavados duas vezes com PBS, ressuspensos em PBS com a concentração de H_2O_2 correspondente ao IC_{50} determinado anteriormente, e incubados por 1 hora a 28 °C. Em seguida foram centrifugadas, ressuspensas em meio LIT e tratadas com diferentes concentrações dos fármacos ou não (controle negativo). Como controle positivo de inibição foi utilizado uma combinação de Rotenona (60 μM) e Antimicina (0,5 μM). Os parasitas foram incubados em placas de cultura de 96 poços em estufa (28 °C). A proliferação celular foi estimada por leitura da DO em λ 620 nm a cada 24 horas durante 8 dias. A DO foi transformada em valores de densidade celular (células/mL) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. A concentração do fármaco que inibiu 50% da proliferação dos parasitas (IC_{50}) foi determinada na fase exponencial de crescimento (quinto dia) mediante ajuste dos dados da curva dose-resposta com a equação clássica sigmóide. Cada concentração foi avaliada em quadruplicata, sendo que os resultados apresentados correspondem a três experimentos independentes.

3.5 Avaliação do tipo de morte celular em parasitas tratados com Memantina

3.5.1 Avaliação da exposição de fosfatidilserina na membrana do parasita

Formas epimastigota (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram cultivadas em meio LIT a 28 °C e tratadas com a concentração correspondente ao IC_{50} de cada composto, determinado nas curvas de crescimento dos parasitas, ou não (controle). Parasitas tratados com estaurosporina (1 μM), 24 horas antes da realização do ensaio, foram utilizados como controle positivo para apoptose. O controle positivo para necrose foi realizado incubando os parasitas durante 30 minutos na presença de 150 μM de digitonina e 1 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio. No quarto dia após o início do tratamento 1.0×10^6 células mL^{-1} de cada tratamento, como também dos controles, foram lavados uma vez com o tampão de anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl_2 , pH 7.4) e ressuspensos em 50 μl do mesmo tampão. Os parasitas foram incubados em gelo e protegidos da luz, por 15 minutos, na presença de anexina-V FITC, Invitrogen (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), conforme instruções do fabricante, e iodeto de propídio (1 $\mu\text{g/mL}$). Após esse período adicionou-se 450 μl do tampão de anexina e os parasitas foram analisados por citometria de fluxo, no equipamento *Guava cytometer* (General Electric)(Jimenez et al., 2008).

3.5.2 Ensaio para quantificação de Ca^{2+} intracelular em formas epimastigotas

Parasitas foram cultivados em LIT tratados com a concentração correspondente ao IC_{50} de cada composto, ou não (controle). No quarto dia após o início do tratamento, 1.0×10^8 células foram incubadas na presença de 5 μM de Fluo-4 AM (Invitrogen) por uma hora a 28 °C. Após esse período as células foram lavadas duas vezes com o tampão Hepes -glicose (50 mM Hepes (pH 7,4), 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0,8 mM $MgSO_4$; 5,5 mM glicose e 2 mM $CaCl_2$), ressuspensas no mesmo tampão e distribuídas em placa de 96 poços ($2,5 \times 10^7$ por poço) em triplicata. A leitura foi realizada no fluorímetro *Spectra Max M3*, *Molecular Devices*, utilizando-se λ excitação 490 nm e λ emissão 518 nm (Dolai et al., 2009).

3.5.3 Ensaio para verificação da geração de espécies reativas de oxigênio

Para quantificar a produção de H_2O_2 pelos parasitas, formas epimastigotas (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram cultivadas em meio LIT a 28 °C e tratadas com a concentração correspondente ao IC_{50} de cada composto, determinado na curva de crescimento do parasita, ou não (controle). Após 24 horas do início do tratamento, 1.0×10^7 células mL^{-1} , tratadas ou não, foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em PBS (5 mM de succinato). Adicionou-se 12 μM do reagente *Amplex Red* e 0,05 U/mL de peroxidase (*Horseradish Peroxidase*). A leitura das amostras foi realizada no fluorímetro *Spectra Max M3*, *Molecular Devices*, utilizando-se λ excitação 563 nm e λ emissão 587 nm.

3.6 Efeito sobre a metaciclogênese

Formas epimastigotas (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram cultivadas em meio LIT e após três dias foram lavadas duas vezes em PBS e transferidas para o meio Grace (Martins et al., 2009) tratados ou não (controle) com a concentração correspondente ao IC_{50} determinado nas curvas de crescimento das formas epimastigotas. No sexto dia após a transferência dos parasitas para o meio Grace foi avaliado o efeito dos fármacos sobre a metaciclogênese. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e a porcentagem de parasitas no estágio metacíclico em relação ao número total de parasitas (epimastigotas + formas metacíclicas) foi avaliado.

3.7 Análises do efeito dos compostos no ciclo intracelular do *T. cruzi*

3.7.1 Toxicidade dos fármacos em células de mamíferos

A toxicidade dos fármacos em células de mamíferos foi avaliada incubando células CHO-K₁ (5.0×10^5 células por poço) em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com SFB (10%) na presença de diferentes concentrações dos fármacos ou não (controle). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada 48 horas após o início do tratamento utilizando-se o método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tretazolio bromide) (Mosmann, 1983). As células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se em cada poço 300 µl de PBS e 60 µl MTT (5mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C durante 3 horas (protegidas da luz). A reação foi interrompida com a adição de 200 µl de SDS 10%. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento da cor azul de formazan homogêneo “thiazolidin”. As placas foram lidas em espectrofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm. O IC₅₀ foi determinado pelo ajuste dos dados em uma equação sigmoideal dose-resposta.

3.7.2 Análise do efeito dos compostos na infectividade das formas tripomastigotas.

Células CHO-K₁ (5.0×10^4 por poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI 10% SFB a 37 °C. Após 24 horas, quando já estavam aderidas à placa, as células foram infectadas com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^6$ por poço) e tratadas com diferentes concentrações dos compostos. Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de quatro horas. Após esse período os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos juntamente com os compostos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e acrescido meio RPMI 10% SFB. A placa foi mantida na estufa a 37 °C por 16 horas. Após esse período o meio RPMI 10% foi substituído por RPMI 2% de SFB e a temperatura alterada de 37 °C para 33 °C. A placa foi mantida a 33 °C e no quinto dia pós-infecção os tripomastigotas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer. O IC₅₀ foi determinado pelo ajuste dos dados em uma equação sigmoideal dose-resposta.

3.7.3 Análise do efeito dos compostos após a invasão celular pelas formas tripomastigotas

Células CHO-K₁ (5.0×10^4 por poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI 10% SFB a 37 °C. Após 24 horas, quando já estavam aderidas à placa, as células foram infectadas com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^6$ por poço). Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de quatro horas. Após esse período os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos. As células foram lavadas duas vezes com PBS, adicionou-se meio RPMI 10% SFB e diferentes concentrações dos compostos ou não (controle). A placa foi mantida na estufa a 37 °C por 16 horas. Após esse período o meio RPMI 10% foi substituído por RPMI 2% de SFB e a temperatura alterada de 37 °C para 33 °C. A placa foi mantida a 33 °C e no quinto dia pós-infecção os tripomastigotas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer. O IC₅₀ foi determinado pelo ajuste dos dados em uma equação sigmoideal dose-resposta.

3.7.4 Avaliação da fase intracelular mais susceptível ao tratamento com os compostos

Para verificarmos em qual fase do ciclo intracelular o parasita é mais susceptível ao tratamento com o fármaco, células CHO-K₁ (5.0×10^4 por poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI 10% SFB a 37 °C. Após 24 horas, quando já estavam aderidas à placa, as células foram infectadas com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^6$ por poço). Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de quatro horas. Após esse período os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se meio RPMI 10% SFB. O tratamento foi realizado em diferentes períodos com a concentração correspondente ao IC₅₀ determinado anteriormente. Diferentes poços foram tratados em diferentes períodos do ciclo: durante o período da invasão celular pelos parasitas, após 24 horas até 60 horas (fase amastigota) e após 60 horas (fase epimastigota intracelular). No quinto dia pós-infecção os parasitas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer. O número de parasitas de cada tratamento foi comparado com o controle, células infectadas não tratadas.

3.8 Análises estatísticas

O programa *Excel 2007* foi utilizado para calcular média e desvio padrão das réplicas dos ensaios. Os programas *OriginPro8* e *GraphPadPrism5* foram utilizados para construção dos gráficos e ajustes dos mesmos, o método *ANOVA* de uma via seguido do teste *Tukey* foi utilizado nas análises estatísticas dos tratamentos em relação ao controle. Para análise de diferença entre grupos foi utilizado o teste *T*. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Curvas de crescimento do *T. cruzi* na presença dos compostos

Os fármacos selecionados para verificação de uma possível atividade anti- *T. cruzi* foram avaliados inicialmente em parasitas no estágio epimastigota, como mostram as curvas de crescimento na **Figura 5**. O fármaco Vigabatrina, que é um inibidor irreversível do receptor GABA T, foi avaliado em diferentes concentrações (50 μ M a 1 mM) (**Figura 5 (a)**). Já a Pregabalina, análogo de GABA, foi avaliada nas concentrações (0,1 a 1 mM) (**Figura 5 (b)**). Os dois fármacos não apresentaram efeito inibitório na proliferação das formas epimastigota. O MTEP 3-((2-metil-4-thiazolil) etinil)piridine, que atua como um antagonista seletivo não competitivo do receptor metabotrópico de glutamato mGluR5, foi avaliado nas concentrações (0,1 a 1 mM) (**Figura 5 (c)**). Observa-se que apenas a concentração 1 mM apresenta efeito inibitório na proliferação de formas epimastigotas, visto que todas as outras concentrações utilizadas inibem menos que o controle realizado com DMSO, solvente utilizado na diluição do composto. O MK-801, antagonista do receptor de glutamato do tipo NMDA, apresentou efeito inibitório na proliferação das formas epimastigotas do *T. cruzi*. Esse composto foi avaliado nas concentrações (0,1 a 1 mM), como observado na **Figura 5 (d)**. O IC₅₀ determinado para o tratamento realizado a 28 °C, pH 7,5 foi de $0,3 \pm 0,028$ mM, conforme **Figura 6 (a)**. A Memantina, que atua no sistema glutamatérgico bloqueando a atividade de receptores de glutamato do tipo NMDA, também foi avaliada nas curvas de crescimento do *T. cruzi*, utilizando-se as concentrações (30 a 300 μ M), como pode ser observado na **Figura 5 (e)**. Esse composto também apresentou efeito anti-proliferativo no crescimento do parasita. Conforme observado na **Figura 6 (b)**, o IC₅₀ determinado a 28 °C, pH 7,5 foi de $172,6 \pm 9$ μ M. Memantina foi o fármaco que apresentou melhor efeito inibitório nas curvas de crescimento das formas epimastigotas.

Figura 5 - Curvas de crescimento de *T. cruzi*, estágio epimastigota, tratados com os fármacos de interesse.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(a) **Vigabatrina** (50 μ M a 1 mM); (b) **Pregabalina** (0,1 a 1 mM); (c) **MTEP** (0,1 a 1 mM); (d) **MK-801** (0,1 a 1 mM) e (e) **Memantina** (30 a 300 μ M). Os parasitas foram mantidos a 28°C, cultivados em meio LIT pH 7,5. O controle negativo (C⁻) foi realizado sem adição de composto na cultura. Para o controle de inibição (C⁺) utilizamos uma combinação de antimicina (0,5 μ M) e rotenona (60 μ M).

Figura 6 - Curvas dose-resposta do *T. cruzi*, estágio epimastigota, para os tratamentos com MK-801 ou Memantina.

(a) parasitas tratados com **MK-801** (0,1 a 1 mM), o IC_{50} determinado foi $0,3 \pm 0,028$ mM. (b) parasitas tratados com **Memantina** (30 a 300 μ M) o IC_{50} determinado foi $172,6 \pm 9$ μ M. A análise foi realizada no quinto dia de crescimento, fase exponencial da cultura, utilizando-se o programa *OriginPro8*.

4.2 Interação com condições de estresse

Estresse térmico e oxidativo

Baseados nos resultados apresentados anteriormente, avaliamos um possível efeito sinérgico entre estresse térmico e o MK-801; e entre o estresse térmico ou oxidativo e a Memantina (**Figura 7**). Como observado na **Figura 7 (a) e (b)**, o MK-801 foi avaliado nas concentrações (0,1 a 0,45 mM) a 33 °C e a 37 °C, respectivamente. Já a Memantina foi avaliada nas concentrações (100 a 500 μ M) a 33 °C e (30 a 300 μ M) a 37 °C, conforme a **Figura 7 (c) e (d)**, respectivamente.

A Memantina também foi avaliada em parasitas estressados oxidativamente. Os parasitas foram tratados com o IC_{50} previamente estabelecido para H_2O_2 (72,6 μ M) por uma hora. Após esse período foram ressuspensos em LIT e tratados com diferentes concentrações de Memantina (30 a 300 μ M) e cultivados a 28 °C, como observado na **Figura 7 (e)**.

Figura 7 - Curvas de crescimento do *T. cruzi*, estágio epimastigota, submetidos ao estresse térmico e oxidativo e tratados com MK-801 ou Memantina.

Os parasitas foram cultivados em meio LIT, pH 7,5, em diferentes temperaturas e tratados com: **(a) MK-801** (0,1 a 0,45 mM) a 33 °C; **(b) MK-801** (0,1 a 0,45 mM) a 37 °C; **(c) Memantina** (100 a 500 μM) a 33 °C; **(d) Memantina** (30 a 300 μM) a 37 °C; **(e)** tratados com 72,6 μM de H₂O₂, por 1 hora, e com diferentes concentrações de **Memantina** (30 a 300 μM) a 28 °C. O controle negativo (C⁻) foi realizado sem adição de composto na cultura. Para o controle de inibição (C⁺) utilizamos uma combinação de antimicina (0,5 μM) e rotenona (60 μM).

Ao avaliarmos os resultados, observamos que não há um efeito sinérgico entre o MK-801 e diferentes temperaturas, visto que o IC_{50} determinado a 33 °C foi de $0,36 \pm 0,06$ mM e a 37 °C foi de $0,29 \pm 0,025$ mM, conforme **Figura 8 (a) e (b)**, respectivamente. Enquanto que o IC_{50} determinado em condições normais de cultivo (parasitas cultivados em LIT a 28 °C) foi $0,3 \pm 0,028$ mM.

A Memantina também não apresentou efeito sinérgico com as diferentes temperaturas ou estresse oxidativo, visto que o IC_{50} determinado nessas condições é maior do que o IC_{50} determinado em condições normais de cultivo (parasitas cultivados em LIT a 28 °C). Para os parasitas cultivados a 33 °C, observou-se um IC_{50} de 402 ± 60 μ M, conforme observado na **Figura 8 (c)** e a 37 °C o IC_{50} foi de 228 ± 8 μ M, como mostra a **Figura 8 (d)**. Em relação ao parasitas submetidos ao estresse oxidativo, quando avaliamos o efeito do tratamento simultâneo com a concentração correspondente ao IC_{25} da Memantina (142 ± 8 μ M) e o IC_{50} do H_2O_2 (72,6 μ M) foi observado uma diminuição na proliferação dos parasitas de $63\% \pm 4\%$, mostrando que não há um efeito sinérgico e sim uma soma dos efeitos dos tratamentos.

Figura 8 - Curvas dose-resposta do crescimento de *T. cruzi*, estágio epimastigota, submetidos ao estresse térmico.

Os parasitas foram tratados com **(a) MK-801** (0,1 a 0,45 mM) a 33 °C, IC_{50} $0,36 \pm 0,06$ mM **(b) MK-801** (0,1 a 0,45 mM) a 37 °C, IC_{50} $0,29 \pm 0,025$ mM; **(c) Memantina** (100 a 500 µM) a 33 °C, IC_{50} 402 ± 60 µM; **(d) Memantina** (30 a 300 µM) a 37 °C, IC_{50} 228 ± 8 µM. A análise foi realizada no quinto dia de crescimento, fase exponencial da cultura, utilizando-se o programa *OriginPro8*.

O MK-801 e a Memantina apresentam o mesmo mecanismo de ação, por meio de receptores de glutamato do tipo NMDA. Devido o fato da Memantina ter apresentado melhor efeito antiproliferativo em relação ao MK-801 e quando administrado aos pacientes, apresenta pouco ou nenhum efeito colateral descrito, decidimos escolher esse composto para prosseguir os experimentos.

Estresse metabólico

Para verificar a resposta de epimastigotas ao estresse nutricional na presença de 172,6 μM de Memantina (IC_{50} determinado anteriormente), $5,0 \times 10^6$ células mL^{-1} foram cultivadas em LIT ou PBS e tratados ou não (controle negativo). As células foram incubadas a 28 °C durante 30 horas e após esse período foi avaliado o nível de ATP intracelular, representado na **Figura 9**. Observa-se uma diminuição nos níveis de ATP dos parasitas cultivados em LIT e tratados com Memantina, sugerindo que há uma interferência no metabolismo energético do parasita. No entanto, não há um efeito sinérgico entre o estresse metabólico e o tratamento, visto que não há diferença estatisticamente significativa entre os parasitas que foram mantidos em PBS e os parasitas que foram mantidos em PBS e tratados.

Figura 9 - Resposta do *T.cruzi*, estágio epimastigota, ao estresse nutricional na presença da Memantina.

Parasitas submetidos ao estresse nutricional e ao tratamento com Memantina (172,6 μM), IC_{50} determinado nas curvas de crescimento. Os parasitas foram incubados por 30 horas em LIT, LIT+Memantina, PBS, PBS+Memantina. Após esse período os níveis de ATP intracelular foram avaliados. Teste *Tukey* $p < 0,05$; **MM**: Memantina; **ns**: não significativo.

4.3 Efeito da Memantina na metaciclogênese

Avaliamos o efeito da Memantina na metaciclogênese utilizando parasitas no estágio epimastigota ($5,0 \times 10^6$ células mL^{-1}) cultivadas em meio LIT, transferidos para o meio Grace e tratados ou não (controle) com 172,6 μM de Memantina (concentração correspondente ao IC_{50} determinado nas curvas de crescimento). No sexto dia após a transferência para meio Grace, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e a porcentagem de parasitas no estágio metacíclico em relação ao número total de parasitas (epimastigotas + formas metacíclicas) foi avaliado. Como demonstrado na **Figura 10**, Memantina interfere na metaciclogênese, pois foi observado que culturas de parasitas tratados apresentam uma diminuição na diferenciação de aproximadamente 30% em relação ao controle.

Figura 10 - Efeito da Memantina na metaciclogênese.

Os parasitas foram cultivados em meio LIT e transferidos para o meio Grace e tratados ou não (controle) com 172,6 μM . No sexto dia após a transferência, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e a porcentagem de parasitas no estágio metacíclico em relação ao número total de parasitas (epimastigotas + formas metacíclicas) foi avaliado. Resultado apresentado é a sobreposição de três ensaios independentes. **Meta**: metacíclico; **Epi**: epimastigota.

4.4 Tipo de morte celular em parasitas tratados com Memantina

Avaliamos também o tipo de morte celular dos parasitas submetidos ao tratamento com Memantina. Os parasitas foram incubados na presença de anexina V-FITC para avaliarmos a exposição de fosfatidilserina na membrana, característica de apoptose, como também na presença de iodeto de propídio para verificarmos uma possível ruptura da membrana do parasita, característica de necrose, conforme descrito em materiais e métodos. Os parasitas foram avaliados por citometria de fluxo como mostra a **Figura 11**. Como observado na **Figura 11(a)**, os parasitas controle (parasitas não tratados) apresentaram 10% de positividade para exposição de fosfatidilserina, enquanto que os parasitas tratados com Memantina apresentaram 42%, conforme **Figura 11(b)**. Outra característica de apoptose observada nesse experimento é a manutenção da integridade da membrana do parasita, visto que as células praticamente não foram marcadas pelo iodeto de propídio. Como observado na **Figura 11 (a) e (b)** o número de células marcadas dentre as que foram tratadas com Memantina e no controle foi 0,46 % e 0,78%, respectivamente. Esses resultados sugerem que os parasitas tratados com Memantina apresentam características de morte do tipo apoptose e não necrose.

Figura 11 - Representação da análise por citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular.

Os parasitas foram tratados com Memantina (172,6 μ M) ou não (controle) durante 4 dias. Após esse período os parasitas foram marcados com anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI) e avaliados. **(a)** parasitas não tratados marcados com anexina e PI; **(b)** parasitas tratados com Memantina marcados com anexina e PI; **(c)** representação gráfica de três experimentos independentes. Controles: **(d)** parasitas não tratados marcados apenas com anexina; **(e)** parasitas não tratados marcados apenas com PI; **(f)** controle positivo para necrose: parasitas não tratados permeabilizados com digitonina e marcados com PI e **(g)** controle positivo para apoptose: parasitas tratados com estaurosporina 24 horas antes do ensaio e marcados com anexina.

Baseados no resultado anterior, avaliamos outras características descritas para apoptose em tripanossomatídeos. Tem sido descrito que o aumento da produção de EROs é o principal evento de sinalização e execução desse processo (Irigoin et al., 2009; Menna-Barreto et al., 2009; Smirlis, Soteriadou, 2011). Portanto avaliamos a produção de H_2O_2 em parasitas tratados com Memantina. Formas epimastigotas foram tratadas com a concentração correspondente ao IC_{50} (172,6 μM) e após 24 horas de tratamento os parasitas foram incubados na presença de *Amplex red* e peroxidase (*horseradish peroxidase*) conforme descrito em materiais e métodos. Como observa-se na **Figura 12**, os parasitas tratados produzem mais H_2O_2 que os parasitas do grupo controle.

Figura 12 - Representação gráfica da quantificação de H_2O_2 .

Formas epimastigotas foram tratadas com Memantina (172,6 μM) ou não (controle) durante 24 horas. Após esse período os parasitas (1.0×10^7) foram lavados por centrifugação, ressuspensos em PBS (5mM de succinato) e adicionou-se 25 μM de *Amplex Red* e 0,05 U/mL de *Horseradish Peroxidase*. As amostras foram analisadas no fluorímetro *Spectra Max M3*, *Molecular Devices*, utilizando-se λ excitação 563 nm e λ emissão 587 nm. Teste *T* $p < 0,05$.

Já foi descrito que além da produção de EROs, a desregulação da homeostase de Ca^{2+} também contribui para a apoptose em tripanossomatídeos (Smirlis et al., 2010). Portanto avaliamos também a concentração intracelular desse cátion em formas epimastigotas expostas ao tratamento com Memantina, conforme descrito em materiais e métodos. Como se pode observar na **Figura 13** a exposição dos parasitas ao tratamento com Memantina aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} quando comparados aos parasitas do grupo controle, sugerindo mais uma vez que o parasita está sofrendo apoptose.

Figura 13 - Representação gráfica da concentração intracelular de Ca^{2+} .

Formas epimastigotas foram tratados com Memantina (172,6 μM) ou não (controle) durante 4 dias. Após esse período os parasitas ($2,5 \times 10^7$) foram incubados com 5 μM de Fluo-4 AM, por 1 hora, a 28 °C, lavadas duas vezes em tampão hepes-glicose e avaliadas no fluorímetro *Spectra Max M3, Molecular Devices*, utilizando-se λ excitação 490 nm e λ emissão 518 nm. Teste T $p < 0,05$.

Observamos também a morfologia dos parasitas tratados com Memantina em relação ao controle. Conforme podemos observar na **Figura 14**, os parasitas tratados apresentam mudança na sua morfologia, apresentando forma arredondada (**Figura 14 (c) e (d)**), em relação ao controle (parasitas que não foram tratados) como mostra a **Figura 14 (a) e (b)**. Uma característica também descrita para células apoptóticas (Kaczanowski et al., 2011; Smirlis et al., 2010).

Figura 14 - Formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Formas epimastigotas no quarto dia de crescimento. **(a)** e **(b)** parasitas sem tratamento (controle), **(c)** e **(d)** parasitas tratados com Memantina (172,6 µM). Coloração: Panótico. Resolução: **(a)** e **(c)** 40x; **(b)** e **(d)** 100x.

4.5 Efeito da Memantina no ciclo intracelular do *T. cruzi*

Verificamos também o efeito da Memantina no ciclo intracelular do parasita, conforme **Figura 15**. Inicialmente foi avaliada a toxicidade do composto em células CHO-K₁, modelo de infecção utilizado por nosso grupo. As células CHO-K₁ foram incubadas por 48 horas na presença de diferentes concentrações (50 µM a 1 mM) ou não (controle) conforme descrito em materiais e métodos. Como se pode observar na **Figura 15 (a)** Memantina é bem tolerada pelas células CHO-K₁, pois nas concentrações abaixo de 0,4 mM (valor acima do IC₅₀ determinado para o estágio epimastigota) não apresenta diferença em relação ao controle. Como observado na **Figura 16 (a)**, o IC₅₀ determinado foi 624,5 ± 46 µM. Com base neste resultado realizamos os ensaios de infecção tratando com concentrações de Memantina não tóxicas para as células CHO-K₁, em diferentes períodos da infecção.

Para verificarmos o efeito do fármaco na infectividade de formas tripomastigotas, as células foram infectadas como descrito em materiais e métodos e tratadas ou não (controle) durante somente o momento da invasão celular, com diferentes concentrações de Memantina (50 a 400 µM) conforme representado na **Figura 15 (b)**. O IC₅₀ determinado nesse tratamento foi de 206,3 µM, como pode ser observado na **Figura 16 (b)**. Em todos os tratamentos foi observada uma diminuição estatisticamente significativa do número de formas tripomastigotas que eclodiram das células tratadas em relação ao controle, conforme **Figura 15 (b)**.

Avaliamos também o efeito no tratamento após a infecção pelo *T. cruzi*. Células CHO-K₁ foram infectadas com formas tripomastigotas e após a invasão celular pelos parasitas iniciamos o tratamento com diferentes concentrações de Memantina (5 a 300 µM), conforme descrito em materiais e métodos. Como observado na **Figura 15 (c)**, todos os tratamentos mostraram uma diminuição estatisticamente significativa no número de formas tripomastigotas. O IC₅₀ determinado foi de 31 µM, conforme **Figura 16 (c)**.

Após a verificação do efeito da Memantina durante a invasão celular e após a infecção, consideramos relevante a avaliação de qual fase do ciclo intracelular (amastigota ou epimastigota intracelular) seria mais susceptível ao tratamento. Neste experimento, como descrito em materiais e métodos, o tratamento foi realizado em diferentes períodos da infecção, com a concentração correspondente ao IC₅₀ (31 µM). O número de parasitas de cada período de tratamento foi comparado com o controle, células infectadas e não tratadas. Como observado na **Figura 15 (d)** a fase mais susceptível ao tratamento é o estágio amastigota, forma intracelular replicativa e infectiva.

Figura 15 - Efeito da Memantina no ciclo intracelular do *T. cruzi*.

(a) Viabilidade das células CHO-K₁ tratadas com diferentes concentrações de Memantina (50 a 1 mM). As células foram incubadas por 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o método de MTT. (b) Efeito na infectividade de formas tripomastigotas. Os parasitas foram tratados somente durante o período da infecção. (c) Efeito no tratamento após a invasão dos parasitas nas células CHO-K₁. (d) Avaliação de qual fase do ciclo intracelular do *T. cruzi* é mais susceptível ao tratamento com Memantina. As células foram tratadas em diferentes períodos com a concentração correspondente ao IC₅₀ determinado anteriormente (31 μ M) T tripomastigota; A amastigota; EI epimastigota. Em todos os experimentos foi avaliada a eclosão de formas tripomastigotas no quinto dia pós-infecção por contagem dos parasitas, que se encontravam no sobrenadante, em câmara de Neubauer. Teste Tukey $p < 0,05$.

Figura 16 - Curvas dose-resposta da toxicidade em células CHO-K₁, infectividade de formas tripomastigostas e tratamento da infecção após a invasão celular.

(a) Resposta das células CHO-k₁ ao tratamento com diferentes concentrações do Memantina (50 μM a 1 mM) durante 48 horas e avaliados pelo ensaio de MTT, IC₅₀ 624,5 ± 46 μM; **(b)** tratamento de parasitas no estágio tripomastigota durante o período da invasão celular com diferentes concentrações de Memantina (50 a 400 μM) IC₅₀ 206,3 μM; **(c)** tratamento da infecção após a invasão pelos parasitas, durante todo o período da infecção com diferentes concentrações de Memantina (5 a 300 μM) IC₅₀ 31 μM. A análise foi realizada no quinto dia após a infecção, pela contagem, em câmara de Neubauer, dos parasitas que encontravam-se no sobrenadante. A determinação do valor de IC₅₀ foi realizada utilizando-se o programa *OriginPro8*.

5 DISCUSSÃO

Como demonstrado nos resultados, os fármacos Vigabatrina (inibidor do receptor GABA T) e Pregabalina (análogo do GABA), não apresentaram efeito inibitório na proliferação de formas epimastigotas. Porém, já havia sido relatado a atividade tripanocida de fármacos análogos de GABA. Por exemplo, o acamprosato, que é utilizado no tratamento da dependência alcoólica, foi avaliado pelo nosso grupo em curvas de crescimento de formas epimastigotas e apresentou efeito inibitório (IC₅₀ 2,50 µM) (Lange, 2012).

Dentre os fármacos com ação glutamatérgica, o MTEP, que atua como um antagonista seletivo não competitivo do receptor metabotrópico mGluR5, também não apresentou efeito inibitório nas curvas de crescimento das formas epimastigotas. Já o MK-801 e a Memantina demonstraram efeito inibitório na proliferação dos parasitas. Ambos atuam em mamíferos bloqueando receptores de glutamato do tipo NMDA, principalmente em humanos, onde esses receptores de glutamato estão bem caracterizados e associados a canais iônicos, principalmente Ca²⁺ (Coan et al., 1987; Lipton, 2005; Xia et al., 2010). Em *T. cruzi*, receptores de glutamato do tipo NMDA ainda não foram caracterizados. Uma análise feita na sequência do genoma de *T. cruzi* demonstrou que não há uma sequência compatível com receptores do tipo NMDA de humanos (TriTrypDB). No entanto, Paveto e colaboradores têm sugerido que *T. cruzi* pode apresentar receptores de glutamato similar ao receptor NMDA descrito para o tecido nervoso, e como ocorre em células neurais, receptores NMDA de *T. cruzi* seriam provavelmente, os principais responsáveis por controlar os níveis de Ca²⁺ citosólico do parasita (Paveto et al., 1995).

MK-801 e Memantina são utilizados no controle de doenças neurodegenerativas ou ligadas ao sistema nervoso central. Já foi demonstrado que o MK-801 apresenta propriedades anestésicas e anticonvulsivantes (Ameer et al., 2010). Em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi observado que a conversão de L-[³H]arginina para [³H]citrulina é estimulada por L-glutamato e NMDA e é bloqueada por EGTA, MK-801 e ketamina (Paveto et al., 1995). Também foi verificada uma diminuição na motilidade de epimastigotas tratados com MK-801, provavelmente por interferência nos níveis de GMP cíclico mediado por óxido nítrico (Pereira et al., 1997). Já a Memantina é uma amina tricíclica, o primeiro da classe de novos medicamentos para a doença de Alzheimer (Lipton, 2005; Xia et al., 2010). Já foi descrita atividade tripanocida para outras aminas. O *Trypanosoma brucei*, por exemplo, é sensível ao tratamento com Rimantadina, uma droga utilizada para o tratamento e profilaxia da infecção pelo vírus da influenza A (Kelly et al., 1999). Kelly e colaboradores também sintetizaram e

testaram vários compostos derivados da aminoadamantana e aminoalquilciclohexano, e observaram que vários desses compostos apresentam atividade considerável contra as formas sanguíneas do *T. brucei*, tanto *in vitro* como também *in vivo* (Kelly et al., 2001). Recentemente, o mesmo grupo sintetizou compostos análogos de amantadina e memantina que continham características estruturais necessárias para atividade antagonista de receptores NMDA e atividade tripanocida. Esses compostos foram avaliados em *T. brucei* e foi observado que a introdução de um grupo etil em C-5 aumenta a atividade tripanocida (Duque et al., 2010).

Ao avaliarmos a interação do MK-801 ou da Memantina com diferentes situações de estresse (metabólico, térmico e oxidativo), observamos que não há interação, visto que os valores de IC_{50} obtidos nessas condições foram maiores ou iguais do que foi obtido quando os parasitas foram mantidos em condições normais de cultivo. Uma interação entre os fármacos e as condições de estresse seria interessante do ponto de vista terapêutico, uma vez que, o *T. cruzi* está exposto a situações de estresse térmico, metabólico e oxidativo durante o seu ciclo de vida, já que transita em diferentes regiões do intestino do inseto vetor e no meio intra e extracelular no hospedeiro mamífero (Silber et al., 2005a). O parasita é submetido ao estresse térmico quando passa pelo inseto vetor, visto que o triatomíneo não regula sua temperatura interna podendo variar de acordo com a temperatura no ambiente externo. Como também o parasita alterna entre o hospedeiro mamífero que apresenta uma temperatura média de 37 °C e o inseto vetor no qual a média de temperatura é 28 °C (Magdaleno et al., 2009). O estresse metabólico ocorre principalmente na porção final do intestino do triatomíneo onde ocorre a diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (Contreras et al., 1985), e no estabelecimento da infecção no citoplasma das células do hospedeiro mamífero, onde devem competir por nutrientes com a própria célula hospedeira. Além do mais os parasitas precisam adaptar-se a disponibilidade de diferentes nutrientes nos diversos ambientes (diferentes meios extracelulares e intracelulares no hospedeiro mamífero e diferentes porções do tubo digestivo no inseto vetor) (Silber et al., 2009). Já o estresse oxidativo pode ocorrer tanto pelo metabolismo do próprio parasita ou pela resposta imune do hospedeiro mamífero (Turens, 2004).

A Memantina também interferiu na metaciclogênese, processo de diferenciação em que o parasita passa do estágio epimastigota (estágio replicativo e não infectivo) para tripomastigota metacíclico (estágio infectivo e não replicativo). Esse processo ocorre naturalmente na porção final do intestino de triatomíneos onde o parasita encontra aminoácidos como prolina, glutamato e aspartato que são importantes nesse processo

(Contreras et al., 1985), pois permitem ao parasita restabelecer os níveis de ATP intracelular necessários à metaciclogênese (Cazzulo, 1992). Os parasitas que foram submetidos ao tratamento apresentaram uma diminuição no número de formas metacíclicas em aproximadamente 30% em relação ao controle. Como já mencionado, também observamos uma diminuição dos níveis de ATP intracelular dos parasitas quando desafiados com Memantina. Provavelmente essa inibição na metaciclogênese pode estar relacionada com a diminuição nos níveis de ATP.

T. cruzi é um parasita intracelular obrigatório, como mencionado anteriormente, no hospedeiro mamífero o parasita passa por diferenciação do estágio tripomastigota para amastigota e novamente para tripomastigota passando por um estágio intermediário chamado epimastigota intracelular (Almeida-De-Faria et al., 1999). Como observado nos resultados a Memantina interfere no ciclo intracelular do *T. cruzi*. Tanto na infectividade de formas tripomastigotas, como no tratamento ao longo do período de infecção, diminuindo o número de formas tripomastigotas que eclodem no quinto dia após a infecção. A fase do ciclo intracelular mais susceptível ao tratamento é o estágio amastigota, único estágio replicativo do ciclo intracelular. Esse dado é muito importante, visto que na fase crônica da doença de Chagas o parasita forma ninhos de amastigotas em tecidos do hospedeiro mamífero, principalmente no tecido cardíaco (Rassi, Marin-Neto, 2010), e nesta fase da doença a eficácia da terapia disponível atualmente é contróverssa (Boscardin et al., 2009; Silber et al., 2005b).

Nossos resultados também sugerem que, o tratamento com Memantina desencadeia o mecanismo de morte celular programada, com características de apoptose, em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Como foi demonstrado, formas epimastigotas tratadas com Memantina apresentam aumento da produção de EROs, diminuição dos níveis de ATP intracelular, aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, exposição de fosfatidilserina na membrana do parasita, além de mudanças morfológicas. Esse tipo de MCD tem sido descrita para protistas unicelulares, incluindo *T. cruzi*, *Plasmodium* e *Leishmania* (Al-Olayan et al., 2002; Ameisen et al., 1995; Das et al., 2001; Duszenko et al., 2006). Alguns autores tem descrito a participação da mitocôndria no processo de apoptose em *T. cruzi*, semelhante ao que ocorre em metazoários, onde a mitocôndria é a principal organela envolvida nesse processo. Mudanças na função mitocondrial, principalmente quando ocorre a produção de (EROs) foram identificadas como o principal evento de sinalização e execução desse processo (Irigoin et al., 2009; Menna-Barreto et al., 2009; Smirlis et al., 2010). Foi descrito também que além do aumento da produção de EROs, a desregulação da homeostase de Ca^{2+} também pode contribuir para a apoptose em tripanossomatídeos (Smirlis et al., 2010).

Os dados apresentados demonstram que dos fármacos estudados apenas Memantina apresentou um melhor efeito tripanocida. Inibe a proliferação de formas epimastigotas, interfere na metaciclogênese, como também afeta o metabolismo energético do parasita com a diminuição dos níveis de ATP, além de desencadear mecanismos que levam a apoptose das formas epimastigotas. Além do mais interfere no ciclo intracelular do parasita, mais especificamente no estágio amastigota. Interessantemente, as fases do ciclo do parasita que são mais afetadas, são as fases que requerem mais energia: estágios replicativos (amastigota e epimastigota), como também os processos de diferenciação e invasão celular. Estes dados sugerem que o metabolismo energético do parasita está sendo afetado, como também provavelmente ocorra uma diminuição na motilidade do parasita pela interferência nos níveis de GMP cíclico mediado por óxido nítrico conforme sugerido por Pereira e colaboradores (Pereira et al., 1997).

Apesar de apresentar valores de IC₅₀ que podem ser considerados altos em relação aos valores descritos para formas epimastigotas tratadas com Benzonidazol (7,6 a 32 µM), variando de acordo com a cepa do *T. cruzi* (Moreno et al., 2010), esses resultados mostram perspectivas promissoras, visto que a Memantina poderá ser utilizado como composto líder para o desenho de derivados com atividade anti-*T. cruzi* otimizada, como já está sendo trabalhado em relação ao tratamento do *Trypanosoma brucei* (Duque et al., 2010). Além do mais já é utilizado em humanos para doença de Alzheimer, sendo bem tolerado pelos pacientes.

6 CONCLUSÕES

Diante do exposto concluímos que:

1- Os fármacos Vigabatrina, Pregabalina e MTEP não apresentaram efeito inibitório nas curvas de crescimento de *T. cruzi*.

2- Os fármacos MK-801 e Memantina apresentaram efeito antiproliferativo em formas epimastigotas, sendo que Memantina apresentou um valor de IC₅₀ mais baixo, sendo, portanto mais eficaz. Interessantemente os dois compostos tem o mesmo mecanismo de ação descrito na literatura para mamíferos: receptores de glutamato do tipo NMDA.

3- Memantina foi capaz de desencadear mecanismos de morte celular programada, do tipo apoptose, em formas epimastigotas, as quais apresentaram exposição de fosfatidilserina na membrana externa, aumento de Ca²⁺ intracelular, aumento da geração de EROs, diminuição dos níveis de ATP e mudanças morfológicas.

4- O processo de metaciclogênese também foi afetado pelo tratamento com Memantina, visto que ocorreu uma diminuição no número de parasitas que diferenciam quando tratados.

5- Memantina é bem tolerada pelas células CHO-K₁, visto que o valor de IC₅₀ determinado quando as células foram desafiadas é quase três vezes maior que o determinado nas curvas de crescimento de formas epimastigotas e mais de dez vezes maior do que o valor determinado no tratamento do ciclo intracelular (CHO-K₁ 624,5 ± 46 µM; formas epimastigotas 172,6 µM e ciclo intracelular 31 µM).

6- A capacidade de infecção de formas tripomastigotas foi diminuída quando os parasitas foram tratados com Memantina, durante o período da invasão celular, como também observou-se uma diminuição do número de parasitas que eclodiram quando as células CHO-K₁ infectadas foram tratadas durante todo período de infecção.

7- O estágio amastigota é a forma mais susceptível ao tratamento com Memantina.

8- As fases do ciclo de vida do parasita mais afetadas são as fases que requerem mais energia: estágios replicativos (amastigota e epimastigota). Como também os processos de diferenciação e invasão celular. Esses dados em conjunto sugerem que o tratamento com Memantina interfere no metabolismo energético do parasita.

REFERÊNCIAS*

- Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1124-31.
- Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol*. 1999;92(4):263-74.
- Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H. Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol*. 2002;32(9):1133-43.
- Alves MJ, Colli W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem*. 2008;47:58-69.
- Ameer NH, Lee JH, Choi MA, Jin GS, Kim MS, Park BR. The Effects of Glutamate NMDA Receptor Antagonist MK-801 on Gastrointestinal Motility after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2010;14(3):151-6.
- Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, et al. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ*. 1995;2(4):285-300.
- Berg M, Van der Veken P, Joossens J, Muthusamy V, Breugelmans M, Moss CX, et al. Design and evaluation of *Trypanosoma brucei* metacaspase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(6):2001-6.
- Bern C, Verastegui M, Gilman RH, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis*. 2009;49(11):1667-74.
- Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. 2009;14(6B):1373-84.
- Brener Z, Chiari E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1963;19:220-4.
- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1971;13(3):171-8.
- Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;149(1):1-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Camargo EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964;12:93-100.

Cancado JR. Criteria of Chagas disease cure. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(1):331-5.

Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA, Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2004;236(1):79-84.

Cazzulo JJ. Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Subcell Biochem. 1992;18:235-57.
Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 1994;26(2):157-65.

Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL. MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. Neurosci Lett. 1987;80(1):111-4.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 1985;16(3):315-27.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002;18(4):171-6.

Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. J Cell Sci. 2001;114(Pt 13):2461-9.

de Souza AP, Melo de Oliveira G, Neve J, Vanderpas J, Pirmez C, de Castro SL, et al. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. Exp Parasitol. 2002;101(4):193-9.

Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. Int J Parasitol. 2003;33(3):257-67.

Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. Quím Nova. 2009;32.

Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interact. 1990;73(1):1-27.

Dolai S, Yadav RK, Pal S, Adak S. Overexpression of mitochondrial *Leishmania* major ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. Eukaryot Cell. 2009;8(11):1721-31.

Duque MD, Camps P, Torres E, Valverde E, Sureda FX, Lopez-Querol M, et al. New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities. Bioorg Med Chem. 2010;18(1):46-57.

- Duschak VG, Couto AS. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2007;2(1):19-51.
- Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol.* 2006;22(11):536-42.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):755-9.
- Gajcy K, Lochynski S, Librowski T. A role of GABA analogues in the treatment of neurological diseases. *Curr Med Chem.* 2010;17(22):2338-47.
- Gran L, Borchgrevink CF. Pain treatment of patients with cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1989;109(33):3424-6.
- Ha KY, Kim YH, Rhyu KW, Kwon SE. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur Spine J.* 2008;17(6):864-72.
- Hampton JR. Lysine uptake in cultured *Trypanosoma cruzi*: interactions of competitive inhibitors. *J Protozool.* 1970;17(4):597-600.
- Hoare C. The Trypanosomes of Mammals.: Blackwell Scientific Publication, Oxford; 1972.
- Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool.* 1989;36(2):150-3.
- Irigoin F, Inada NM, Fernandes MP, Piacenza L, Gadelha FR, Vercesi AE, et al. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 2009;418(3):595-604.
- Iso Y, Grajkowska E, Wroblewski JT, Davis J, Goeders NE, Johnson KM, et al. Synthesis and structure-activity relationships of 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine analogues as potent, noncompetitive metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists; search for cocaine medications. *J Med Chem.* 2006;49(3):1080-100.
- Jimenez V, Paredes R, Sosa MA, Galanti N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):688-98.
- Jung MJ, Lippert B, Metcalf BW, Bohlen P, Schechter PJ. gamma-Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J Neurochem.* 1977;29(5):797-802.
- Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors.* 2011;4:44.
- Kelly JM, Miles MA, Skinner AC. The anti-influenza virus drug rimantadine has trypanocidal activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):985-7.

Kelly JM, Quack G, Miles MM. In vitro and in vivo activities of aminoadamantane and aminoalkylcyclohexane derivatives against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1360-6.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2:1463-7.

Lange IES. Estudo dos efeitos dos psicofármacos acamprosato e levomepromazina sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.

Laverriere M, Cazzulo JJ, Alvarez VE. Antagonic activities of *Trypanosoma cruzi* metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation. *Cell Death Differ*. 2012;19(8):1358-69.

Lipton SA. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res*. 2005;2(2):155-65.

Liu JL, Li M, Dang XR, Wang ZH, Rao ZR, Wu SX, et al. A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PLoS One*. 2009;4(10):e7548.

Lockshin RA, and Williams, C.M. Programmed Cell Death. *J Insect Physiol*. 1964:643.

Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 2009;4(2):e4534.

Magdaleno A, Mantilla BS, Rocha SC, Pral EMF, Silber AM. The involvement of glutamate metabolism in the resistance to thermal, nutritional and oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*. *Enzyme Research*. 2011.

Maguire JH. Chagas' disease--can we stop the deaths? *N Engl J Med*. 2006;355(8):760-1.

Mancilla R, Naquira C, Lanás C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1967;21(2):154-9.

Marin Neto JA, Simoes MV, Sarabanda AV. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol*. 1999;72(3):247-80.

Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun*. 2009;77(7):3023-32.

Maya JD, Bollo S, Nunez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurant derivatives. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(6):999-1006.

- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007;146(4):601-20.
- Menna-Barreto RF, Correa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ, et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2009;136(5):499-510.
- Moreira DR, Leite AC, dos Santos RR, Soares MB. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr Drug Targets*. 2009;10(3):212-31.
- Moreno M, D'Avila D A, Silva MN, Galvao LM, Macedo AM, Chiari E, et al. *Trypanosoma cruzi* benzimidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):918-24.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- O'Daly JA, Serrano LE, Rodriguez MB. Free aminoacid pool and proteolytic enzymes in *Trypanosoma cruzi* cultured in vitro. *Int J Parasitol*. 1983;13(5):433-40.
- Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, Esteva M, et al. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 1995;270(28):16576-9.
- Pereira C, Paveto C, Espinosa J, Alonso G, Flawia MM, Torres HN. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(2):155-6.
- Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber A, Alves MJ, Bouvier LA, et al. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS Lett*. 2002;526(1-3):111-4.
- Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, et al. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Lett*. 2003;554(1-2):201-5.
- Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM, Torres HN. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. 1999;46(6):566-70.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot*. 2009;72(2):441-6.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol*. 2000;23(12):883-9.
- Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
- Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52270-81.

- Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2004;279(50):52270-81.
- Rohloff P, Rodrigues CO, Docampo R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. Mol Biochem Parasitol. 2003;126(2):219-30.
- Rojas RLG. Análise de Transporte de Glutamato e GABA em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(1):75-85.
- Senkovich O, Bhatia V, Garg N, Chattopadhyay D. Lipophilic antifolate trimetrexate is a potent inhibitor of *Trypanosoma cruzi*: prospect for chemotherapy of Chagas' disease. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(8):3234-8.
- Silber A, Tonelli R, Martinelli M, Colli W, Alves M. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(6):441-6.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. Curr Drug Targets Infect Disord. 2005;5(1):53-64.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. Curr Drug Targets Infect Disord. 2005;5(1):53-64.
- Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 2006;36(2):157-63.
- Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-e-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2009;168(1):102-8.
- Smirlis D, Duszenko M, Ruiz AJ, Scoulica E, Bastien P, Fasel N, et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. Parasit Vectors. 2010;3:107.
- Smirlis D, Soteriadou K. Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. Virulence. 2011;2(3):253-6.
- Soeiro MN, de Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. Expert Opin Ther Targets. 2009;13(1):105-21.
- Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp Biochem Physiol B. 1976;55(3B):443-7.

Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol. 2004;6(8):733-41.

Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Mol Aspects Med. 2004;25(1-2):211-20.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 2001;31(5-6):472-81.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol. 2003;19(11):495-501.

Urbina JA, Vivas J, Visbal G, Contreras LM. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. Mol Biochem Parasitol. 1995;73(1-2):199-210.

Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des. 2002;8(4):287-95.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 2010;115(1-2):55-68.

Wilkinson SR, Kelly JM. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. Biol Chem. 2003 Apr;384(4):517-25.

World Health Organization – WHO. Chagas disease (American Trypanosomiasis). 2012 [updated 2012; cited 2013 fevereiro]. Available from: www.who.int/.

Xia P, Chen HS, Zhang D, Lipton SA. Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. J Neurosci. 2010 18;30(33):11246-50.

Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. J Parasitol. 1960;46:541-51.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051-4.