

SANDRA CARLA ROCHA

Avaliação das perspectivas terapêuticas do ácido  
*L*-tiazolidina-4-carboxílico, um análogo de prolina, na  
infecção de camundongos pelo *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  
2010

SANDRA CARLA ROCHA

Avaliação das perspectivas terapêuticas do ácido  
*L*-tiazolidina-4-carboxílico, um análogo de prolina, na  
infecção de camundongos pelo *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

São Paulo  
2010

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

© reprodução total

Rocha, Sandra Carla.

Avaliação das perspectivas terapêuticas do ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico, um análogo de prolina, na infecção de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi* / Sandra Carla Rocha. -- São Paulo, 2010.

Orientador: 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: Metabolismo de aminoácidos em tripanossomatídeos

Versão do título para o inglês: Evaluation of the therapeutic perspectives of the *L*-thiazolidine-4-carboxylic acid, a proline analogue, on mice infection by *Trypanosoma cruzi*.

Descritores: 1. Quimioterapia 2. Aminoácidos 3. Metabolismo 4. Prolina 5. *Trypanosoma cruzi* 6. Ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico  
I. Silber, Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0213/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Sandra Carla Rocha.

Título da Dissertação: Avaliação das perspectivas terapêuticas do ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico, um análogo de prolina, na infecção de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Ariel Mariano Silber.

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

**Aprovado(a)**

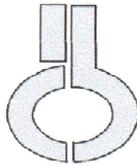
**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

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



**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) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **067** nas fls. **58** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Ariel M. Silber, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Avaliação das perspectivas terapêuticas do ácido L-thiazolidine-4-carboxílico, um análogo da prolina, na infecção de camundongos pelo Trypanosoma cruzi**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Sandra Carla Rocha e a pesquisadora Ana Claudia Trocoli Torrecilhas** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.08.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de agosto de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI  
Secretária  
CEEA - ICB/USP

A minha família pelo cuidado e amor  
incondicional durante toda a minha vida

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força a cada dia e por ter colocado pessoas tão preciosas no meu caminho, ao longo desses dois anos.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber pela presença, orientação, paciência, confiança, amizade, carinho, mas especialmente pelos conselhos motivadores que me levaram a amar cada dia mais o meu trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Ana Cláudia Torrecilhas por ter me ensinado todo o trabalho de experimentação *in vivo*, pela paciência, carinho, amizade, disposição, mas, sobretudo pelos conselhos e por ter acreditado em meu potencial.

À Beth pelo suporte técnico, disposição, amizade, conselhos e por ter compartilhado de sua experiência.

Aos colegas Lisvane, Brian, Anahí e Josué que me receberam no laboratório, a dois anos atrás, e me ajudaram com os primeiros experimentos com paciência e disposição. Mas, agradeço especialmente ao Brian e Lisvane que até hoje contribuem com meu trabalho.

Aos colegas do laboratório, Denise, Flavinha, Flávia Damasceno, Marcel pela amizade e carinho, mas especialmente aos colegas Inga, Jean e Julia que colaboraram com experimentos e explicações.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Silvia Boscardin e aos demais integrantes de seu laboratório pela amizade, colaboração e sugestões que contribuíram muito para este trabalho.

Ao Prof Dr. Cláudio Marinho e aos seus alunos, pela amizade, pelo apoio e discussões de resultados que também contribuíram muito para este trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Carolina Elias e aos seus alunos pela parceria, discussões de trabalhos e principalmente pela amizade.

Aos demais colegas do departamento de Parasitologia-ICB (USP), professores, funcionários e colegas que também colaboraram com equipamentos, com sugestões, discussões e amizade.

Ao CNPQ pela bolsa e suporte para essa pesquisa, FAPESP e à USP.

Aos meus pais e todos os meus amigos que torcem por mim!

*“...Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.*

*Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.*

*E ainda que eu distribua todos os meus bens entre os pobres e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará.*

*O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece, não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal;*

*não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade;*

*tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará;*

*porque, em parte, conhecemos e, em parte, profetizamos.*

*Quando, porém, vier o que é perfeito, então, o que é em parte será aniquilado.*

*Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, pensava como menino; quando cheguei a ser homem, desisti das coisas próprias de menino.*

*Porque, agora, vemos como em espelho, obscuramente; então, veremos face a face. Agora, conheço em parte; então, conhecerei como também sou conhecido.*

*Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor...”*

## RESUMO

Rocha SC. Avaliação das perspectivas terapêuticas do ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico, um análogo de prolina, na infecção de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*. [dissertação (Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

*Trypanosoma cruzi* é dependente de prolina para diversos processos tal como metabolismo energético, invasão celular, diferenciação e resistência a estresse osmótico, metabólico e oxidativo. O ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico (T4C), um análogo estrutural da prolina, inibe competitivamente o transporte deste aminoácido em *T. cruzi*, e interage sinergicamente com fatores de estresse que ocorrem ao longo do seu ciclo de vida. Aqui nós avaliamos o efeito de T4C na infecção de camundongos pelo *T. cruzi*. Foi observada uma redução de 49% do pico parasitêmico de animais infectados e tratados com dose única de T4C (100 mg/Kg). A análise histológica e por PCR quantitativa de diferentes tecidos revelou uma redução significativa da carga parasitária apenas no intestino de animais tratados com T4C (100 ou 150 mg/Kg). Por outro lado, a dose única de 200 mg/Kg diminuiu o peso corporal e sobrevida de animais não infectados. O tratamento prolongado (10 mg/Kg dia) não reduziu a parasitemia, mas aumentou a sobrevida e diminuiu a carga parasitária no intestino. T4C não afetou a expressão gênica de IFN- $\gamma$  e IL-10 em qualquer um dos tecidos analisados (coração, baço e intestino). Em conclusão, T4C contribui em reduzir a virulência da infecção, mas é tóxico em doses que superem 150 mg/kg.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. T4C. Prolina. Metabolismo

## ABSTRACT

Rocha SC. Evaluation of the therapeutic perspectives of the *L*-thiazolidine-4-carboxylic acid, a proline analogue, on mice infection by *Trypanosoma cruzi*. [Master thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

*Trypanosoma cruzi* is dependent on proline for a variety of processes such as energy metabolism, host cell invasion, differentiation and resistance to osmotic, metabolic and oxidative stress. *L*-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), a proline structural analogue, inhibits the proline uptake and interacts with several stress factors that the parasite undergoes throughout its life cycle. Herein, we evaluated the T4C effects on mice infection by *T. cruzi*. It was observed a reduction of 49% of the parasitemia peak in infected mice that were treated with a unique dose of T4C (100 mg/Kg). Histological and PCR quantitative analysis of several tissues revealed a reduction (90,3 %) of parasite load in the intestine (150 mg/kg). In the other hand, the unique dose of 200 mg/Kg reduced the body weight and survival of non-infected mice. A T4C prolonged treatment (10 mg/Kg day), did not diminish the parasitemia, but increased survival and reduced the parasite load in the intestine. T4C did not affect the gene expression of  $\gamma$ -IFN and IL-10 in any of the organs analyzed (heart, spleen and intestine). In conclusion, T4C-treatment contributes to reduce the virulence of *T. cruzi* infection, but it was toxic in doses over 150 mg/kg.

**Keyword:** *Trypanosoma cruzi*. T4C. Proline. Metabolism

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição geográfica da doença de Chagas em áreas endêmicas e não endêmicas.	18
Figura 2.	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
Figura 3.	Estruturas químicas das drogas disponíveis <i>contra Trypanosoma cruzi</i> .	24
Figura 4.	Representação esquemática do metabolismo de L-prolina.	32
Figura 5.	Representação estrutural de prolina e seu análogo T4C.	33
Figura 6.	Picos parasitêmicos em camundongos Balb/C infectados i.p. com 500, 750 ou 1.000 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	48
Figura 7.	Curva de mortalidade de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500, 750 ou 1000 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	49
Figura 8.	Peso corporal e curva de mortalidade de camundongos Balb/C não infectados e tratados com dose única e prolongada de T4C.	51
Figura 9.	Evolução da curva parasitêmica em camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados i.p. com dose única de T4C.	52
Figura 10.	Curva de mortalidade de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com dose única de T4C.	53
Figura 11.	Histologia do intestino de camundongos Balb/C na fase aguda (15 d.p.i) da infecção experimental pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	55
Figura 12.	Mensuração da carga parasitária no 15 d.p.i. em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose única de T4C.	56
Figura 13.	Curvas de regressão linear construídas a partir de diluições seriadas à razão 1:10 de DNAg de tecidos, com primers específicos para <i>Trypanosma cruzi</i> (TCZ).	60

<b>Figura 14.</b>	<b>Curvas de regressão linear construídas a partir de diluições seriadas à razão 1:10 de DNAg de tecidos, com primers específicos para Fator de Necrose Tumoral-<math>\alpha</math></b>	<b>62</b>
<b>Figura 15.</b>	<b>Mensuração da carga parasitária no dia 15 d.p.i em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose única de T4C, através da técnica PCRq.</b>	<b>63</b>
<b>Figura 16.</b>	<b>Picos parasitêmicos e curva de mortalidade de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados i.p. com doses prolongadas (10 dias) de T4C.</b>	<b>64</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Mensuração da carga parasitária no 15 d.p.i. em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose prolongada (10 dias) de T4C.</b>	<b>65</b>
<b>Figura 18.</b>	<b>Mensuração da carga parasitária no dia 15 d.p.i em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose prolongada (10 dias) de T4C, através da técnica PCRq.</b>	<b>67</b>
<b>Figura 19.</b>	<b>Curvas de regressão linear construídas a partir de quantidades arbitrárias de RNAm tecidual diluídas seriadamente à razão 1:5, com <i>primers</i> específicos para citocinas murinas.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 20.</b>	<b>Varição (aumento ou diminuição) da expressão de RNAm de citocinas em tecidos no dia 10 d.p.i de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose prolongada (10 dias) de T4C.</b>	<b>72</b>
<b>Figura 21.</b>	<b>Variações relativas das atividades dos transportadores de glicose e prolina e concentrações de prolina intracelular livre durante o ciclo de vida do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>.</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Situação atual de alguns dos principais candidados a desenvolvimento de quimioterapia específica contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .	26
<b>Tabela 2 -</b>	Valores de inclinação da curva, Y na origem e R <sup>2</sup> obtidos com a construção da curva-padrão utilizando <i>primers</i> específicos para <i>Trypanosoma cruzi</i> (TCZ).	59
<b>Tabela 3 -</b>	Valores de inclinação da curva, Y na origem e R <sup>2</sup> obtidos com a construção da curva-padrão utilizando <i>primers</i> específicos para Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ murino (TNF- $\alpha$ ).	61
<b>Tabela 4 -</b>	Valores de inclinação da curva, Y na origem e R <sup>2</sup> obtidos com a construção da curva-padrão utilizando <i>primers</i> específicos para IFN- $\gamma$ , IL-10 e $\beta$ -actina murinos.	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
ALAT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
$\beta$ -ACT	Beta-actina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de busca por alinhamento local)
BZN	Benzonidazol
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de Cálcio
CD	Cluster of differentiation (Conjunto de diferenciação)
cDNA	DNA complementar
CHO-K <sub>1</sub>	Linhagem celular proveniente de ovário de hamster Chinês
Ct	<i>Threshold cycle</i> (Ciclo limiar de detecção)
d.p.i.	Dias depois da infecção
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL <sub>50</sub>	Dose-Letal 50 %
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAg	DNA genômico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Comissão de nomenclatura de enzimas)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	gramas
GSA	Glutamato semi-aldeído
H&E	hematoxilina e eosina
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Intra-peritoneal
IFN- $\beta$	Interferon-beta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
KCL	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
KO	Nocaute
L	Litros
LB	Luria-Bertani (meio utilizado para o crescimento de manutenção de bactérias)
LIT	Liver Infusion-Tryptose
log	Logarítmico
mg	Miligramas

mM	Milimolar
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio monobásico anidro
NaCl	Cloreto de Sódio
NFX	Nifurtimox
ng	Nanogramas
NH <sub>2</sub>	Grupo amino
NH <sub>3</sub>	Amônia
NK	Natural Killers
NO	Óxido nítrico
OAT	Ornitina aminotransferase
P5C	Pirrolina-5-carboxilato
P5C	Δ-pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	Δ-pirrolina 5 carboxilato desidrogenase
P5CR	Δ-pirrolina-5-carboxilato redutase
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRO	Prolina
ProDH	Prolina desidrogenase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
RT-PCR <sub>q</sub>	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa - via transcriptase reversa
SFB	Soro fetal bovino
T4C	Acido <i>L</i> -tiazolidina-4-carboxílico
TAT	Tirosina aminotransferase
TcrHT1	Gene que codifica o transportador de hexose em <i>Trypanosoma cruzi</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
Th	Célula T auxiliadora
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon- $\beta$
Tris	Tris-(hidroxometil)-aminometano
UI	Unidade internacional
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranoside
$\Delta C_t$	Delta- <i>Threshold cycle</i>
$\Delta\Delta C_t$	Delta-delta- <i>Threshold cycle</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1</b>	<b>A Doença de Chagas</b> .....	18
<b>1.2</b>	<b>O ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	19
<b>1.3</b>	<b>Manifestações clínicas</b> .....	21
<b>1.4</b>	<b>Infecção chagásica e resposta imune</b> .....	22
<b>1.5</b>	<b>Tratamento da Doença de Chagas</b> .....	23
1.5.1	<i>Drogas disponíveis</i> .....	23
1.5.2	<i>Perspectivas terapêuticas</i> .....	25
<b>1.6</b>	<b>Transporte de metabólitos em <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	26
1.6.1	<i>Transporte de glicose</i> .....	27
1.6.2	<i>Transporte de aminoácidos</i> .....	28
<b>1.7</b>	<b>O ácido <i>L</i>-tiazolidina-4-carboxílico ou tioprolina (T4C)</b> .....	33
1.7.1	<i>Metabolismo de T4C</i> .....	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	35
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos animais</b> .....	36
<b>3.2</b>	<b>Obtenção e manutenção das cepas de <i>T. cruzi</i></b> .....	36
3.2.1	<i>Formas tripomastigotas sanguíneas</i> .....	36
3.2.2	<i>Formas epimastigotas</i> .....	36
<b>3.3</b>	<b>Infecção e tratamento</b> .....	37
3.3.1	<i>Ensaio de infecção e administração única de T4C</i> .....	37
<b>3.4</b>	<b>Avaliação da parasitemia e sobrevivência</b> .....	37
<b>3.5</b>	<b>Determinação da DL<sub>50</sub> da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	38
<b>3.6</b>	<b>Avaliação dos indicadores de efeitos tóxicos de T4C</b> .....	38
<b>3.7</b>	<b>Técnica histológica e análise da carga parasitária</b> .....	38
<b>3.8</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa e análise da carga parasitária</b> .....	38
3.8.1	<i>Extração de DNAg de tecidos</i> .....	39
3.8.2	<i>Construção das curvas-padrão para PCR quantitativa (PCRq)</i> .....	39
3.8.3	<i>PCR em tempo real ou PCRq</i> .....	39
3.8.4	<i>Tratamento de dados</i> .....	40
<b>3.9</b>	<b>Análise de expressão gênica das citocinas interferon-gama (IFN-<math>\gamma</math>) e interleucina-10 (IL-10) em tecidos</b> .....	41
3.9.1	<i>Extração de RNA total de tecidos</i> .....	41
3.9.2	<i>Teste de eficiência dos primers IFN-<math>\gamma</math>, IL-10 e <math>\beta</math>-ACT</i> .....	42
3.9.3	<i>Padrões de calibração quantitativa</i> .....	42
3.9.4	<i>PCR quantitativa - via Transcriptase Reversa</i> .....	45
3.9.5	<i>Tratamento de dados</i> .....	46
<b>3.10</b>	<b>Análises de dados e estatísticas</b> .....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
<b>4.1</b>	<b>Determinação da Dose-Letal 50 % (DL<sub>50</sub>) da cepa Y de <i>T. cruzi</i></b> .....	48
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de toxicidade de T4C</b> .....	49

<b>4.3</b>	<b>Infecção e tratamento com T4C em dose única.....</b>	<b>51</b>
4.3.1	<i>Parasitemia e sobrevida.....</i>	51
4.3.2	<i>Avaliação da carga parasitária em tecidos.....</i>	53
<b>4.4</b>	<b>Infecção e tratamento prolongado com T4C.....</b>	<b>64</b>
4.4.1	<i>Parasitemia e sobrevida.....</i>	64
4.4.2	<i>Avaliação da carga parasitária em tecidos.....</i>	65
4.4.3	<i>Avaliação da expressão gênica das citocinas IFN-<math>\gamma</math> e IL-10 em tecidos.....</i>	68
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeito de T4C (dose única) sobre a infecção <i>in vivo</i>, pelo <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2</b>	<b>Efeito do tratamento prolongado de T4C sobre a infecção <i>in vivo</i> pelo <i>T. cruzi</i>...</b>	<b>77</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação dos indicadores de efeitos tóxicos de T4C.....</b>	<b>79</b>
<b>5.4</b>	<b>Danos teciduais mediados por drogas.....</b>	<b>80</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da carga parasitária em tecidos.....</b>	<b>81</b>
<b>5.6</b>	<b>Expressão gênica de IFN-<math>\gamma</math> e IL-10 em tecidos.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma infecção parasitária crônica e sistêmica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Classicamente este organismo era localizado taxonomicamente na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Hoare, 1966). Porém, mais recentemente um novo ordenamento taxonômico foi proposto para os eucariotas, com base numa realocização dos protozoários. Neste novo esquema, o *T. cruzi* localiza-se dentro do super-grupo Excavata, que por sua vez contém taxa de menor hierarquia. Dentro de Excavata, o *T. cruzi* localiza-se nos ranks superiores (em ordem hierárquica) dos Kinetoplastea, Metakinetoplastina, Trypanosomatina. Este último rank agrupa também aos patógenos *Leishmania spp.* e *Trypanosoma brucei* (Adl et al., 2005)

A doença de Chagas (ou tripanossomíase americana) foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas e afeta hoje, aproximadamente 8 milhões de pessoas na América Latina, desde o sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile (Rassi et al., 2010) (Figura 1). Aproximadamente, 30% dos indivíduos infectados desenvolvem cardiomiopatia, megasíndromes digestivas, ou ambas as formas, ocorrendo 12.500 mortes a cada ano (Moncayo e Silveira, 2009; Rassi et al., 2010).

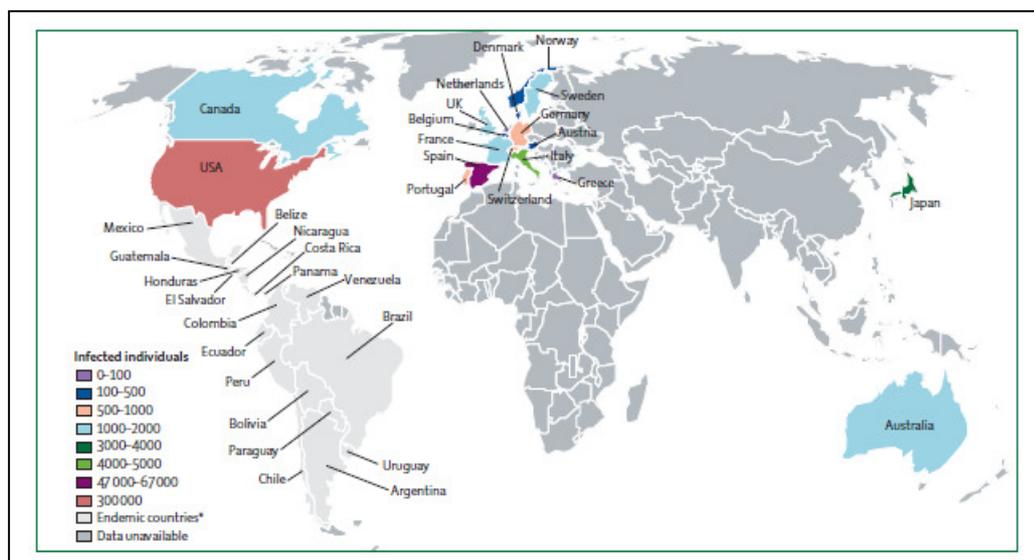


Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas em áreas endêmicas e não endêmicas  
Fonte: Rassi et al. (2010).

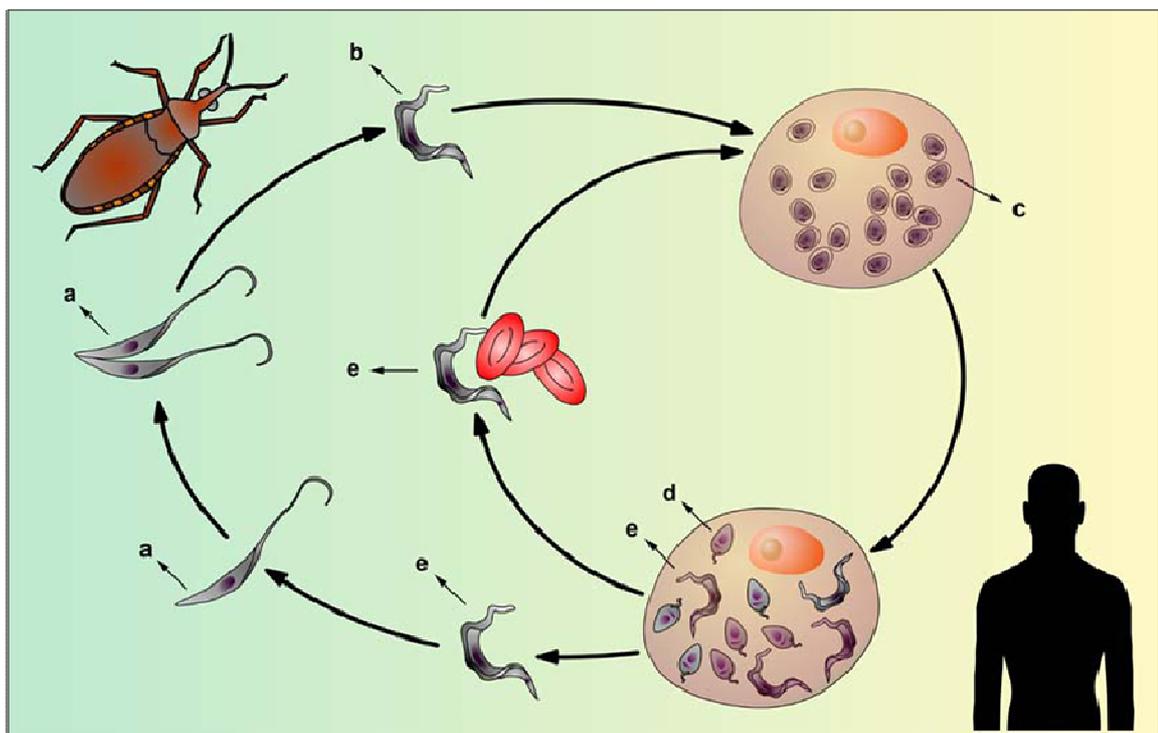
A doença é transmitida ao homem e para mais de 150 espécies de mamíferos, principalmente pelo inseto vetor hematófago da subfamília Triatominae por meio dos ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre (Deane, 1964). Os três insetos vetores mais importantes na transmissão do *Trypanosoma cruzi* ao homem são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Zeledon e Rabinovich, 1981). A transmissão da doença de Chagas ocorre também por outros mecanismos não-vetoriais como transfusão sanguínea (Mazza et al., 1936) e transmissão congênita (Bittencourt, 1976; Hoff et al., 1978), sendo esses os principais mecanismos de contaminação pelo parasita em regiões urbanas e não-endêmicas. Outra forma de transmissão que vem crescendo nos últimos anos em regiões não-endêmicas (Figura 1), devido ao aumento do fluxo de imigrantes provenientes da América Latina, é pela via de transplantes de tecidos vindos de pacientes chagásicos (Schmunis, 2007). Onde não domicilia o inseto vetor, raramente a doença de Chagas é transmitida ao homem pela ingestão de alimentos contaminados. Por outro lado, em regiões endêmicas, a transmissão oral ao homem é bastante comum devido à presença das fezes contaminadas do triatomíneo depositadas sobre alimentos que potencialmente serão comercializados e ingeridos. (Benchimol-Barbosa, 2009; Rassi et al., 2010).

## **1.2 O ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* possui um complexo ciclo de vida envolvendo um inseto vetor da família Reduviidae e um hospedeiro mamífero (eventualmente o homem) (Chagas, 1909).

O inseto infecta-se ao picar um hospedeiro mamífero infectado que possui formas tripomastigotas circulantes no sangue. Os tripomastigotas ingeridos pelo inseto vetor alcançam a porção média do tubo digestivo onde se diferenciam em epimastigotas, formas não-infectivas replicativas (Brenner, 1973). Na porção terminal do tubo digestivo os epimastigotas aderem-se ao epitélio intestinal e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas) (Bonaldo et al., 1988) que são eliminadas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Uma vez depositadas na pele do mamífero, os tripomastigotas internalizam-se no hospedeiro, invadem as suas células, e atingem o citoplasma. Nesse local, se diferenciam em amastigotas, estágio replicativo no interior do hospedeiro mamífero. Após vários ciclos de divisão binária, os amastigotas diferenciam-se para formas tripomastigotas passando de maneira transiente por um

estágio denominado epimastigota intracelular (Almeida-De-Faria et al., 1999). Finalmente, os tripomastigotas lisam as células e são liberados ao meio extracelular, podendo invadir outras células vizinhas, ou atingir a corrente sanguínea, e através dela atingir tecidos distantes. Quando as formas tripomastigotas estão em circulação, podem ser ingeridas por um inseto vetor, fechando desta forma o ciclo de vida (Tyler e Engman, 2001; Alves e Colli, 2007) (Figura 2).



**Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Formas epimastigotas replicativas e não replicativas, presentes no inseto vetor (a). Formas infectivas, eliminadas nas fezes e urina do hospedeiro invertebrado (b). As formas tripomastigotas metacíclicas invadem as células do hospedeiro vertebrado e diferenciam-se nas formas amastigotas (c), dando origem ao estágio transitente denominado epimastigota intracelular (d), que se diferencia em tripomastigotas (e). Os tripomastigotas podem disseminar através da corrente sanguínea do mamífero. O ciclo se completa quando estas últimas diferenciam-se novamente em formas epimastigotas, as quais colonizam o tubo digestivo de um novo inseto vetor durante o repasto sanguíneo.

Fonte: Boscardin et al. (2010).

### 1.3 Manifestações clínicas

A infecção humana pelo *T. cruzi* pode se dividir em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda dura cerca de 4 a 8 semanas e caracteriza-se basicamente por uma alta parasitemia, e ausência de anticorpos circulantes, enquanto que a fase crônica caracteriza-se pelo baixo ou nulo número de parasitas circulantes e uma robusta resposta humoral, a qual persiste por toda a vida do hospedeiro (Dias et al., 1956; Dias, 1984; Boscardin et al., 2010).

A fase aguda é geralmente assintomática. No entanto, nos casos sintomáticos, podem ser observados febre, dor de cabeça, edema, enfartamento ganglionar e sinais da porta de entrada do parasita, como por exemplo, sinal de Romaña. Em alguns casos (cerca de 5 a 10 %), ainda podem ser observados uma miocardite severa ou meningoencefalite ou até mesmo, ambas, o que eventualmente pode levar ao óbito. A maioria dos indivíduos infectados (cerca de 90 %) resolve espontaneamente à fase aguda, mesmo se a infecção não for tratada com drogas tripanocidas, e então evolui para a fase crônica (Punukollu et al., 2007; Rassi et al., 2010).

As principais formas da fase crônica são a indeterminada, a cardíaca (cardiopatia chagásica crônica), a digestiva e a cardiodigestiva. A forma indeterminada é a mais freqüente, caracterizando-se pela ausência de sintomas. Cerca de 70 % dos indivíduos infectados cursam a fase crônica na forma indeterminada. Apesar da ausência de sintomatologia, a infecção pode ser detectada sorologicamente pela presença de anticorpos específicos contra *T. cruzi*. Entretanto, os eletrocardiogramas e exames radiológicos do coração, colón e esôfago são normais. O restante de pacientes infectados (cerca de 30 %) desenvolvem as formas cardíaca ou digestiva ou ainda, a cardiodigestiva, geralmente de 10 a 30 anos após o início da infecção (Rassi et al., 2010). Na forma digestiva ocorrem disfunções gastrointestinais (principalmente megaesôfago, megacólon, ou ambos) (Castro et al., 1994; Boscardin et al., 2010). O megaesôfago causa disfagia com odinofagia, combinada com dor epigástrica, regurgitação, ptialismo e subnutrição em casos severos. O megacólon geralmente abrange o segmento sigmóide, reto, e/ou colón descendente, produzindo obstipação prolongada, distensão abdominal e ocasionalmente, obstrução do intestino devido ao fecaloma ou vólculo de sigmóide. A forma cardíaca é a manifestação mais séria e freqüente da doença de Chagas. Ela leva à anormalidade do sistema de condução, bradiarritmias, aneurisma apical, falência cardíaca, tromboembolismo, e morte súbita (Marin Neto et al., 1999; Moncayo e Ortiz Yanine, 2006; Boscardin et al., 2010).

## 1.4 Infecção chagásica e resposta imune

Cada fase da doença de Chagas exibem características e mecanismos imunológicos distintos, sendo que o controle da infecção na fase aguda depende fundamentalmente da resposta inata, enquanto na fase crônica depende de uma potente resposta humoral, a ativação de células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e a produção de citocinas, processos que em conjunto estão envolvidos no controle da doença (Boscardin et al., 2010). A ausência de alguns destes componentes da resposta imune leva a uma maior suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, resultando em uma maior taxa de parasitemia e mortalidade (Tarleton et al., 1992; Rottenberg et al., 1993; Abrahamsohn e Coffman, 1996; Tarleton et al., 1996; Kumar e Tarleton, 1998; Boscardin et al., 2010).

Na imunidade inata alguns padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) derivados de *T. cruzi* são reconhecidos por receptores específicos do hospedeiro, os receptores Toll (TLR) (Campos e Gazzinelli, 2004). As vias de sinalização desses receptores podem ser reguladas pelo fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), pela proteína adaptadora contendo domínio TIR (TIRAP), pela proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon- $\beta$  (TRIF) e pela molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (Takeda e Akira, 2007). Foi demonstrada em camundongos nocautes (KO) TLR-9 e TLR-9/2 uma diminuição da resposta IL-12 e IFN- $\gamma$ , tornando-os também mais suscetíveis à infecção por *T. cruzi* (Bafica et al., 2006). Esses resultados sugerem que TLR-2 e TLR-9 cooperam para controlar a replicação do *T. cruzi* durante a fase aguda (Boscardin et al., 2010). Outro componente importante da imunidade inata são as células *Natural Killers*. Além de lisarem diretamente as células infectadas, as NKs são capazes de produzir enormes quantidades de IFN- $\gamma$ , principalmente no fígado de camundongos durante a fase aguda da infecção, o que é consequência da produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  pelas células dendríticas e macrófagos (Golgher e Gazzinelli, 2004; Sardinha et al., 2006; Cardillo et al., 2007).

A relevância do IFN- $\gamma$  na fase aguda da infecção está relacionada com a capacidade desta citocina de ativar macrófagos peritoniais. Os macrófagos ativados são capazes de produzir óxido nítrico (NO) através da NO sintase induzível (iNOS), provocando a morte do parasita (Nathan et al., 1979; Reed, 1988; McCabe e Mullins, 1990; Vray et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992). Além de IFN- $\gamma$ , outras citocinas são importantes durante a fase aguda da infecção pelo *T.*

*cruzi*. Camundongos deficientes em IL-12 mostraram maiores parasitemia e mortalidade comparadas com os controles, demonstrando a relevância desta citocina (Michailowsky et al., 2001; Galvao Da Silva et al., 2003). A importância da IL-10 como moduladora da infecção também foi demonstrada, já que a sua ausência reduziu a parasitemia em camundongos infectados com *T. cruzi* (Abrahamssohn e Coffman, 1996).

A resposta imune adaptativa na doença de Chagas é mediada principalmente pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e constitui um meio efetivo de controlar a replicação do parasita (Brener e Gazzinelli, 1997). Foi mostrado também que a resposta Th1 é importante para o controle da infecção enquanto a resposta Th2 contribui para a persistência parasitária e para o aumento da severidade da doença (Boscardin et al., 2010). As células T CD8<sup>+</sup> também exercem um papel importante no controle da infecção por *T. cruzi*, pois são capazes de lisar diretamente as células infectadas (Nickell et al., 1993; Wizel et al., 1997).

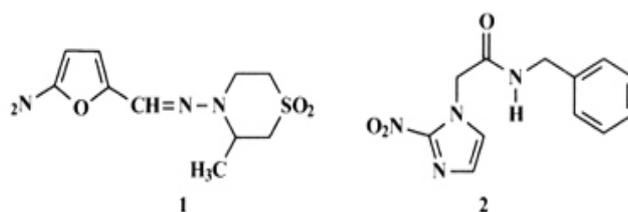
Está bem demonstrada também, a importância dos anticorpos para o controle da infecção crônica por *T. cruzi*. Quando o soro de pacientes chagásicos ou de camundongos foi inoculado em camundongos naïves, tanto a parasitemia quanto a mortalidade foram reduzidas após o desafio com *T. cruzi* (Krettli e Brener, 1976; Kierszenbaum, 1980). As células T são importantes para o controle inicial da infecção, no entanto, uma resposta efetiva mediada por anticorpos é crítica para o aumento da sobrevivência do hospedeiro (Boscardin et al., 2010).

## **1.5 Tratamento da doença de Chagas**

### *1.5.1 Drogas disponíveis*

Tanto as revisões clássicas (Brener, 1975) quanto as mais recentes (Coura e De Castro, 2002; Pinto Dias, 2006; Coura, 2009; Urbina, 2010) documentam uma análise exaustiva dos esforços históricos em desenvolver drogas anti-*T. cruzi*, desde a descoberta da doença em 1909 por Carlos Chagas. Em meio a esses esforços, a busca de compostos com maiores efeitos anti-*T. cruzi* e menor citotoxicidade que pertencessem a classe de derivados de nitro-heterocíclicos com atividade antiparasitária já demonstrada em modelos animais, levaram a descoberta entre as décadas de 60 e 70 do Nifurtimox (NFX; Lampit®; Bayer S.A., Leverkusen, Nordrhein-Westfalen, Alemanha) (5-nitrofurano (3-metil-4-(5-nitrofurfurylideneamino) tetrahydro-4H-

1,4-tiazine-1,1-dioxide) e Benzonidazol (BZN; Rochagan®, Roche S.A.; São Paulo, SP, Brasil; Radanil®; Roche S.A.; Buenos Aires, Capital Federal, Argentina) (N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide). Estes compostos originalmente registrados para o tratamento da fase aguda, até esta data são as únicas drogas disponíveis para o tratamento específico da doença de Chagas (Coura e De Castro, 2002; Pinto Dias, 2006; Urbina, 2010) (Figura 3).



**Figura 3. Estruturas químicas das drogas disponíveis contra *Trypanosoma cruzi*.** (1) Nifurtimox; (2) Benzonidazol

Benzonidazol e Nifurtimox demonstram ser efetivos para o tratamento da fase aguda da infecção, apresentando em média 80% de cura parasitológica (Cancado, 1999, 2002). No entanto, seus efeitos podem variar de acordo com a área geográfica, provavelmente devido às diferenças de suscetibilidades apresentadas por diferentes cepas de *T. cruzi* (Filardi e Brener, 1987; Murta et al., 1998; Kirchhoff, 1999). Em geral, essas drogas mostraram-se pouco eficazes quando administradas durante a fase crônica, além de apresentarem efeitos tóxicos (Jannin e Villa, 2007). De acordo com as recomendações em 2005 e 2007, o tratamento com Benzonidazol, a única droga fornecida hoje no Brasil, é fortemente recomendado para todos os casos agudos, congênitos, de reativação da infecção, para todas as crianças infectadas e pacientes até 18 anos de idade que apresentam fase crônica (Bern et al., 2007).

O Benzonidazol, por muitos anos, foi fornecido pela empresa Roche que cedeu a sua tecnologia de fabricação para uma empresa em Pernambuco, a Lafepe, que passou a ser o único laboratório no Brasil, a partir de 2009, a fornecer o medicamento. O principal modo de ação de Benzonidazol está relacionado à formação de derivados reativos intermediários, como o radical nitroânion e metabólitos eletrofílicos (derivados nitroso e hidroxilamina) (Docampo, 1990; Maya et al., 2007; Dias et al., 2009). O Nifurtimox é produzido pela Bayer para tratamento da doença de Chagas em alguns países da América Latina e, além disso, para tratamento da tripanossomíase africana Gambiense no continente africano (Jannin e Villa, 2007). A ação

antiparasitária do nifurtimox está associada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Docampo, 1990; Maya et al., 2007; Dias et al., 2009)

### 1.5.2 *Perspectivas terapêuticas*

Devido às limitações significantes das drogas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, particularmente para pacientes crônicos, novas abordagens terapêuticas vêm avançando nas últimas décadas (Tabela 1).

Uma das vias de inibição que está sendo bastante explorada é a biossíntese de ergosterol em *T. cruzi*. Novos derivados triazólicos dos quais são potentes inibidores seletivos da síntese de ergosterol, demonstraram forte atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*. Dois deles são, o posaconazol (Urbina et al., 1998; Ferraz et al., 2007, 2009) e o ravuconazol (Urbina e Docampo, 2003; Urbina et al., 2003; Diniz Lde et al., 2010) dos quais são os candidatos mais avançados para o desenvolvimento da nova droga anti - *T. cruzi*, partindo para ensaios clínicos dentro de pouco tempo (Urbina, 2010). Compostos que inibem a enzima cisteína protease, ou mais precisamente, a cruzipaína, também são candidados para o desenvolvimento de quimioterapias. Inibidores seletivos, tal como N-metil-piperazina-urea-F-hF-vinil-sulfona-phenil, conhecido como CRA-3316 ou K-777, apresenta efeito tripanocida *in vitro* e *in vivo* em modelos murinos de infecção aguda (Engel et al., 1998) e além disso, previne danos no miocárdio em cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* (Barr et al., 2005). Outros grupos de pesquisas têm identificado enzimas envolvidas no metabolismo da tripanotiona como alvos quimioterápicos promissores (Fairlamb e Cerami, 1992; Schmidt e Krauth-Siegel, 2002; Paulino et al., 2005) a Tripanotiona sintetase e redutase. A Tioridazina, inibidora da Tripanotiona redutase *in vitro* (Gutierrez-Correa et al., 2001a, b), também mostrou efeito protetor em modelo murino de infecção aguda (Rivarola et al., 1999; Lo Presti et al., 2004). Outra abordagem foi encontrar inibidores da via captação-de-purina de *T. cruzi*. A enzima chave desta via é a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase. O alupurinol análogo da purina atua como um competidor inibindo esta via. O Alupurinol demonstrou ser ativo em modelos murinos de infecção aguda (Urbina e Docampo, 2003).

**Tabela 1-**Situação atual de alguns dos principais candidatos a desenvolvimento de quimioterapia específica contra *Trypanosoma cruzi*.

Composto	Via de inibição	Alvo quimioterápico em <i>T.cruzi</i>	Fase da pesquisa	Fase da doença em que há efeito	Fonte
D0870	Biossíntese de ergosterol	Esterol 14-demetilase	<i>In vivo</i>	aguda e crônica	(Urbina et al., 1996)
TAK-187	Biossíntese de ergosterol	Esterol 14-demetilase	<i>In vivo</i>	aguda e crônica	(Corrales et al., 2005)
Albaconazol (UR-9825)	Biossíntese de ergosterol	Esterol 14-demetilase	<i>In vivo</i> (cães)	aguda	(Urbina et al., 2000; Guedes et al., 2004)
Posaconazol	Biossíntese de ergosterol	Esterol 14-demetilase	<i>In vivo</i> ; candidato para ensaios clínicos	aguda e crônica	(Urbina et al., 1998; Ferraz et al., 2007; 2009)
Ravuconazol	Biossíntese de ergosterol	Esterol 14-demetilase	<i>In vivo</i> (cães); candidato para ensaios clínicos	aguda	(Urbina e Docampo, 2003; Urbina et al., 2003; Diniz Lde et al., 2010)
E5700	Biossíntese de ergosterol	Escaleno sintase	<i>In vivo</i>	aguda	(Urbina et al., 2004)
ER-119884	Biossíntese de ergosterol	Escaleno sintase	<i>In vivo</i>	aguda	(Urbina et al., 2004)
K-777		Cisteína protease (cruzipaína)	<i>In vivo</i> (cães)	aguda e crônica	(Doyle et al., 2007)
Alopurinol	Obtenção de purina	hipoxantina-guanina fosforibosil transferase	<i>In vivo</i>	aguda	(Urbina e Docampo, 2003)
Tioridazina		Tripanotiona redutase	<i>In vivo</i>	aguda	(Rivarola et al., 1999; Lo Presti et al., 2004)

FONTE: Urbina (2010).

## 1.6 Transporte de metabólitos em *Trypanosoma cruzi*

Os tripanossomatídeos patogênicos apresentam um ciclo de vida que alterna em diferentes ambientes (exemplo: o trato intestinal do inseto, o sangue do hospedeiro vertebrado e o citoplasma da célula hospedeira) e a disponibilidade de metabólitos presentes nestes espaços é fundamental para a sobrevivência desses parasitas. Para isso, os tripanossomatídeos são capazes de utilizar carboidratos e aminoácidos como fontes de carbono e energia (Cazzulo, 1992a, 1994; Silber et al., 2005).

### 1.6.1 Transporte de glicose

A glicose é a principal fonte de carbono nos estágios de cultura axênica dos tripanossomatídeos, os quais apresentam em seu citoplasma uma organela de compartimentalização de enzimas glicolíticas, o glicossoma (Cazzulo, 1994). Os tripanossomatídeos possuem também proteínas necessárias para a aquisição de glicose do meio externo, os transportadores de hexose. Particularmente em *T. cruzi*, existe apenas um único sistema de transporte de hexose, cujo gene foi identificado e caracterizado funcionalmente (TcrHT1). Este transportador foi descrito em epimastigotas (Tetaud et al., 1997), e mais recentemente sua atividade foi também analisada nos estágios do ciclo infetivo em mamíferos tais como tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas intracelulares (Silber et al., 2009).

Assume-se que uma vez no citoplasma, a glicose é transportada para dentro dos glicossomos, para ser oxidada. Recentemente foi proposto que o TcrTH1 também tem a função de internalizar glicose desde o citoplasma para o glicossomo (Silber et al., 2009). No glicossomo, cada molécula de glicose é rapidamente convertida em duas moléculas de gliceraldeído-1-3-bisfosfato por enzimas glicolíticas presentes nesta organela. Estas moléculas produzidas, por sua vez, são transportadas ao citoplasma por outro sistema ainda não caracterizado e convertidas em fosfoenol piruvato, dos quais podem seguir dois caminhos: (i) conversão a piruvato, parte do qual poder ser transportado para a mitocôndria para entrar no Ciclo de Krebs, e outra parte transformada em alanina por trasaminação ainda no citoplasma; (ii) transporte de volta ao glicossomo com a conseqüente conversão em oxaloacetato pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase. O oxaloacetato é convertido a malato pela malato desidrogenase. O malato deixa o glicossomo e é convertido de volta a piruvato por enzimas málicas presentes no citoplasma (este sistema constitui desta forma uma lanzadera de elétrons entre o glicossomo e o citoplasma) ou então, transportado à mitocôndria onde poderá ser convertido a piruvato por enzimas málicas mitocondriais e ser oxidado no Ciclo de Krebs. Como já mencionado, ambos os estoques de piruvato mitocondrial e citoplasmático poderão, por sua vez, ser aminados e convertidos em alanina (Cazzulo, 1992b, 1994; Urbina, 1994; Bakker et al., 1999).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* usam preferencialmente a glicose, abundante nos fluídos do hospedeiro vertebrado. No entanto, no hospedeiro invertebrado, a maior fonte de

carbono e energia para *T. cruzi* são aminoácidos especialmente a L-prolina e a L-glutamina, do qual são abundantes na hemolinfa e nos fluídos teciduais do inseto vetor hematófago (Cannata e Cazzulo, 1984; Fairlamb e Opperdoes, 1986). Já as formas intracelulares que residem no citoplasma da célula do hospedeiro mamífero apresentam baixa ou nula atividade de transporte de glicose, sugerindo que sua principal fonte de energia são os aminoácidos, dentre eles a prolina, que pode ser fornecida por biossíntese ou hidrólise de proteínas endógenas (no caso de amastigotas), ou até mesmo fornecida exogenamente pelo próprio hospedeiro vertebrado (no caso de epimastigotas intracelulares) (Silber et al., 2009).

### 1.6.2 Transporte de aminoácidos

Grande parte do metabolismo de *T. cruzi* está baseado na utilização de aminoácidos como fonte de carbono e energia. Como mencionado anteriormente, os aminoácidos podem ser obtidos de três principais formas: biossíntese a partir de precursores metabólicos, transporte ativo a partir do meio circundante e por degradação de proteínas. Determinadas proteínas, por exemplo, podem ser obtidas pelo processo de pinocitose que são estocadas em organelas chamadas reservossomos (Soares e De Souza, 1988).

Em particular, os epimastigotas de *T. cruzi* catabolizam preferencialmente glicose, e depois da exaustão desse metabólito, ocorre o catabolismo de proteínas e aminoácidos com produção de amônia (Cazzulo, 1992b, 1994). Trabalhos clássicos mostraram que asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, leucina, isoleucina e prolina são metabolizados pelo *T. cruzi* (Zeledon, 1960; Mancilla et al., 1967; Sylvester e Krassner, 1976). Foi proposto que todos esses aminoácidos são convertidos em glutamato ou aspartato, podendo ser esses últimos desaminados para serem processados via Ciclo de Krebs (Silber et al., 2005).

Na literatura já está bem descrito para *T. cruzi*, que vários aminoácidos exercem funções que vão além da síntese protéica e metabolismo energético, pois estão envolvidos em processos tais como osmorregulação (Rohloff et al., 2003; Rohloff et al., 2004), crescimento (Pereira et al., 2002) e resistência ao estresse (Pereira et al., 2003). Logo abaixo está descrito o metabolismo dos principais aminoácidos na biologia de *Trypanosoma cruzi*.

#### **a) Metabolismo do Glutamato**

O glutamato desempenha um papel crítico em tripanosomatídeos sendo um intermediário metabólico entre a prolina e o ácido tricarbóxico (Krassner e Flory, 1972; Ter Kuile e Opperdoes, 1992; Obungu et al., 1999; Lamour et al., 2005). Juntos com alanina e aspartato, o glutamato está diretamente envolvido na alimentação do ciclo de Krebs com intermediários (Silber et al., 2005). O grupo amino ( $-NH_2$ ) do glutamato pode ser transferido ao piruvato por meio da enzima alanina aminotransferase (ALAT) e, até certo ponto, pela tirosina aminotransferase (TAT), gerando  $\alpha$ -ketoglutarato e alanina. Outra via do qual o glutamato é convertido em  $\alpha$ -ketoglutarato é por glutamato desidrogenase, uma enzima bem estudada, que apresenta duas isoformas: uma mitocondrial e a outra citoplasmática (Cazzulo et al., 1977; Juan et al., 1978; Cazzulo et al., 1979; Juan, Cazzulo e Segura, 1979; Juan, Segura e Cazzulo, 1979; Walter e Ebert, 1979; Carneiro e Caldas, 1983; Duschak e Cazzulo, 1991). Glutamato está envolvido na osmorregulação (Rohloff et al., 2004) e na metaciclo gênese (Contreras et al., 1985).

#### **b) Metabolismo do Aspartato**

O Aspartato também está envolvido no suprimento dos intermediários do ciclo de Krebs através da aspartato aminotransferase. Esta enzima, do qual apresenta características similares às enzimas dos mamíferos, transfere o grupo amino ( $-NH_2$ ) do aspartato a  $\alpha$ -ketoglutarato, gerando glutamato e oxaloacetato (Cazzulo et al., 1977). O glutamato obtido como subproduto pode ser então processado via ciclo de Krebs. A aspartato aminotransferase pode também transaminar os três aminoácidos aromáticos e a alanina. Os grupos aceitadores são o piruvato (convertido em alanina),  $\alpha$ -ketoglutarato (convertido em glutamato) e oxaloacetato (convertido em aspartato) (Montemartini et al., 1993; Montemartini et al., 1995), embora o seu principal papel é conversão do piruvato em alanina (Frydman et al., 1990). Como a TAT catalisa uma transaminação reversível entre aspartato ou alanina e aminoácidos aromáticos, parece ser uma enzima chave na biosíntese desses aminoácidos. Ambas as isoformas de glutamato desidrogenase também participam da biosíntese de aminoácidos pela sua habilidade de incorporar  $NH_3$  no  $\alpha$ -ketoglutarato gerando glutamato (Caldas et al., 1980). O aspartato é um dos compostos que induz a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (metaciclo gênese), sendo transportado por ambas as formas do parasita. O transporte de

aspartato compete apenas com o de glutamato, sugerindo que este sistema de transporte é específico para aminoácidos aniônicos (Canepa et al., 2005).

**c) Metabolismo da Glutamina**

Dentro do hospedeiro invertebrado L-glutamina juntamente com a L-prolina constituem as maiores fonte de carbono e energia para *T. cruzi*, do qual são abundantes na hemolinfa e nos fluídos teciduais do inseto vetor hematófago (Cannata e Cazzulo, 1984; Fairlamb e Opperdoes, 1986). A glutamina pode ser sintetizada a partir do glutamato e NH<sub>3</sub> na presença de glutamina sintetase (Caldas et al., 1980). Como esta reação é reversível, a glutamina pode ser oxidada pela via glutamato.

**d) Metabolismo da leucina e isoleucina**

Sabe-se que, a leucina e isoleucina, que são inibidores da prolina desidrogenase (ProDH), a primeira enzima do catabolismo da prolina, inibem a indução da metacicloênese por este aminoácido em *T. cruzi* (Contreras et al., 1985; Homsy et al., 1989). A leucina e isoleucina são aminoácidos de cadeia ramificada. Nenhum gene que codifica as enzimas desta via, a aminotransferase (EC 2.6.1.42), a leucina desidrogenase (EC 2.6.1.6) ou a oxidase (EC 1.4.3.2), foi encontrado no genoma de *T. cruzi*. No entanto, foi descrito que a enzima tirosina aminotransferase de *T. cruzi* (EC 2.6.1.5) catalisa o primeiro passo da via de degradação da leucina e isoleucina (Nowicki et al., 2001). Os dois passos seguintes são catalisados pela subunidade  $\beta$  da 2-oxoisovalerato desidrogenase (EC 1.2.4.4) (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00280.html>), gerando 3-metilbutanoil-CoA no caso da leucina, e (S)-2-metilbutanoil-CoA no caso da isoleucina (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00280.html>).

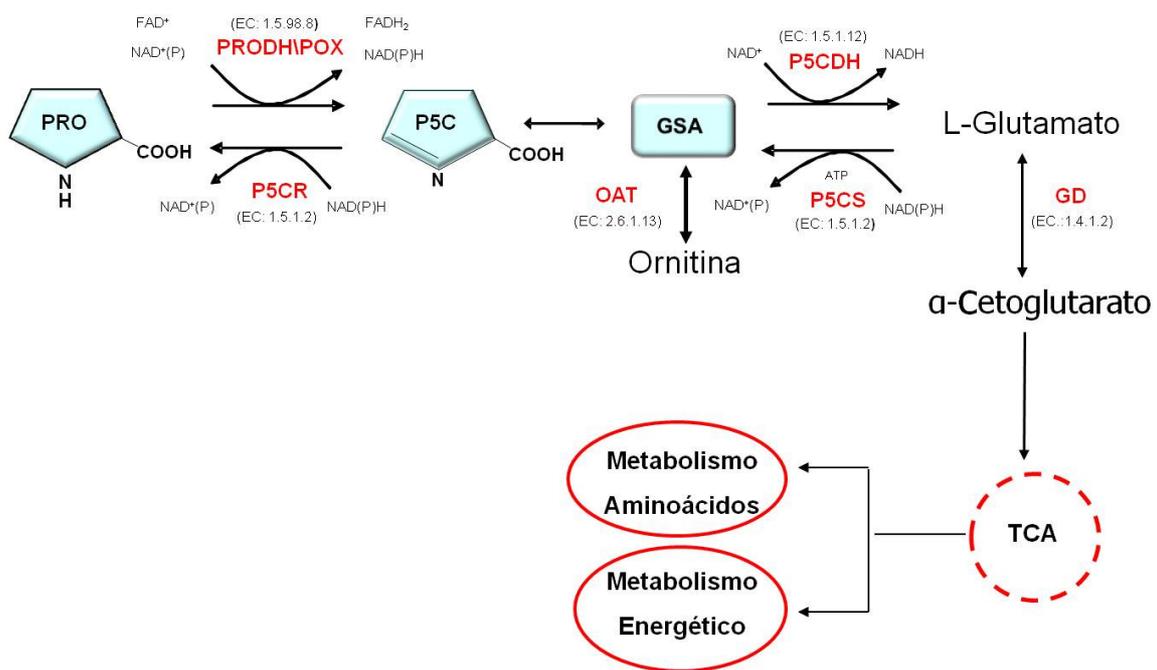
**e) Metabolismo da prolina**

A prolina em particular, atua como um importante osmoprotetor, participando da resposta ao estresse osmótico quando o *T. cruzi* circula em diferentes ambientes como o tubo digestivo do inseto, o sangue do hospedeiro mamífero ou o citoplasma da célula hospedeira. Além desses processos, a prolina é um aminoácido importante no fornecimento de energia para a invasão das células do hospedeiro mamífero (Martins et al., 2009). Também foi mostrada a relevância da prolina, no sustento energético das formas intracelulares (Silber et al., 2009), na diferenciação celular de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Contreras et al., 1985; Homsy et al., 1989) e de epimastigotas intracelulares para tripomastigotas, processo que acontece no

citoplasma das células infectadas (Tonelli et al., 2004). Finalmente, foi mostrada também a sua participação nos mecanismos de resistência a diferentes tipos de estresse (Magdaleno et al., 2009).

O transporte de prolina em epimastigotas de *T. cruzi*, primeiro passo do seu metabolismo, ocorre por meio de dois sistemas ativos, sendo um deles dependente do gradiente de  $H^+$  da membrana plasmática e o outro dependente da hidrólise direta de ATP (Silber et al., 2002). Por outro lado, foi descrita também a presença de uma prolina racemase (Reina-San-Martin et al., 2000) que foi posteriormente caracterizada (Chamond et al., 2003) e parece estar envolvida na metaciclologênese (Chamond et al., 2005), o que reforça o papel da prolina ou seus derivados metabólicos na diferenciação entre estágios em *T. cruzi*. Sabe-se ainda que, a leucina e isoleucina, que são inibidores da prolina desidrogenase (ProDH), a primeira enzima do catabolismo da prolina, inibem a indução da metaciclologênese por este aminoácido (Contreras et al., 1985; Homsy et al., 1989).

Resultados recentes do nosso laboratório (ainda não publicados) mostraram que a prolina efetivamente é oxidada a glutamato através de duas enzimas que agem de forma seqüencial: uma prolina desidrogenase (ProDH) e uma  $\Delta$ -pirrolina 5 carboxilato desidrogenase (P5CDH) (Figura 4). Nesse sentido, foi explorada a atividade tripanocida de análogos de prolina com especial ênfase naqueles com atividade inibitória do transporte desse aminoácido.



**Figura 4. Representação esquemática do metabolismo de L-prolina.** O primeiro passo na degradação da prolina (**PRO**) é a sua conversão a pirrolina-5-carboxilato (**P5C**) pela prolina desidrogenase (**PRODH**). Em seguida, P5C pode ser convertida espontaneamente a glutamato semialdeído (**GSA**), o qual é reduzido de volta a prolina pela enzima pirrolina-5-redutase (**P5CR**) ou ainda ser convertida a glutamato pela pirrolina-5-desidrogenase (**P5CDH**). Posteriormente, o glutamato é desaminado gerando  $\alpha$ -cetoglutarato pela glutamato desidrogenase. O  $\alpha$ -cetoglutarato por sua vez, entra no ciclo de Krebs, e assim participa dos metabolismos energético e de aminoácidos. Alternativamente, a P5C-GSA pode ser convertida a ornitina pela ornitina aminotransferase (**OAT**) e participar das reações do ciclo da uréia. Fonte: Paes (2010).

## 1.7 O ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico ou tioprolina (T4C)

T4C é um aminoácido derivado da cisteína e análogo em estrutura molecular à prolina, tendo em seu anel um enxofre no lugar de um carbono (Figura 5). O T4C foi preparado e descrito pela primeira vez por Schubert em 1936 e depois descrito independentemente por Clarke e Ratner em 1937 (Schubert, 1936; Ratner e Clarke, 1937). O método de síntese deste aminoácido consiste numa reação de condensação entre cisteína e formaldeído, do qual resulta o T4C (Schubert, 1936). De acordo com a literatura, o T4C pode atuar como agente oxidante intracelular e quelante de radicais livres (Weber et al., 1982). Está descrito que T4C, *in vitro*, melhora a atividade de enzimas antioxidantes (De La Fuente e Miquel, 2009) e *in vivo*, melhora diversas funções de células imunes, como por exemplo a função de macrófagos peritoniais de camundongos com fenótipo de senescência acelerada (Correa et al., 1999). Além disso, T4C mostrou atividade inibitória sobre o crescimento de bactérias *Escherichia coli*, demonstrando potencial para o tratamento de infecções do trato urinário (Unger e Demoss, 1966a; b).

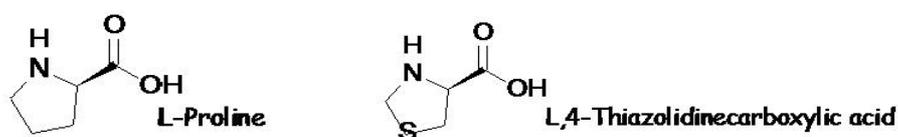


Figura 5. Representação estrutural de prolina e seu análogo T4C.

### 1.7.1 Metabolismo de T4C

Foi sugerido que T4C inibe o crescimento de *Escherichia coli* devido a sua interferência com o transporte de L-prolina substituindo-a no RNA transportador-prolil correspondente (Unger e Demoss, 1966a, b). Além disso, também foi sugerido que T4C pode inibir a síntese de prolina em *E. coli*, melhorando a incorporação deste análogo nas proteínas (Unger e Demoss, 1966b). Quando bactérias *E. coli* são submetidas em um meio livre de prolina, elas são capazes de ativamente oxidar T4C, e o produto desta oxidação pode ser usado como fonte de carbono para síntese das bases nitrogenadas guanina e uracila (Unger e Demoss, 1966a). Em células hepáticas e renais de ratos, T4C é oxidado pela prolina oxidase mitocondrial, sendo hidrolisado

a N-formilcisteína, e por último em cisteína e ácido fórmico por enzimas citosólicas (Bohler et al., 1989). Da mesma forma, o T4C foi capaz de inibir a síntese de prolina em folhas murchas de vegetais que sintetizam e acumulam prolina rapidamente em condições de estresse hídrico (Elthon e Stewart, 1984). Essa inibição não teve nenhum efeito sobre a enzima ácido P5C redutase que converte P5C em prolina. Por outro, T4C não teve nenhuma influência sobre a incorporação de prolina em proteínas de plantas. Além disso, os autores demonstraram que as concentrações entre 0,2 e 1 mM de T4C inibiram a oxidação de prolina na mitocôndria isolada de cevada etiolada, esta inibição foi relacionada com a atividade da prolina desidrogenase e não com o transporte de prolina para a matriz mitocondrial (Elthon e Stewart, 1984).

Todas essas informações sugerem que a atividade inibitória de T4C sobre o crescimento de *T. cruzi* poderia ser devido a qualquer um desses processos mencionados em que a prolina participa. Recentemente, Magdaleno et al. (2009), demonstraram que T4C inibe competitivamente o transporte de prolina em *T. cruzi*, diminuindo o estoque de prolina intracelular, no entanto, a atividade da prolina desidrogenase e prolina racemase não foi inibida (Magdaleno et al., 2009). Além disso, T4C inibiu o crescimento de formas epimastigotas ( $CI_{50}=0,88$  mM) e interagiu sinergicamente com condições de estresse que o parasita sofre ao longo do seu ciclo de vida, tais como estresse térmico, nutricional e particularmente estresse oxidativo. Mais ainda, houve uma diminuição significativa no número de parasitas liberados no meio de cultura, quando culturas de células CHO-K<sub>1</sub> infectadas por tripomastigotas foram tratadas com uma concentração de 10 mM de T4C. (Magdaleno et al., 2009).

A partir dos dados de inibição do ciclo infectivo *in vitro*, e apesar das altas concentrações nas quais esse efeito foi evidenciado (10 mM), resolveu-se avaliar a atividade *in vivo* do T4C sob a hipótese de que na presença constante dos fatores de estresse mencionados acima, esse análogo iria ter um melhor desempenho do que nos experimentos *in vitro*. Esses dados em conjunto colocam o T4C como um possível terapêutico de interesse para o controle da infecção pelo *T. cruzi*. Com base nesses dados, no presente projeto propomos avaliar o efeito do T4C num modelo de infecção aguda experimental pelo *T. cruzi*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar o efeito, assim como as perspectivas terapêuticas, do análogo estrutural da prolina, ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico (T4C), na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em modelo animal.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito de T4C sobre a parasitemia, mortalidade e carga parasitária em tecidos de camundongos Balb/c infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.
- Avaliar os indicadores de efeitos tóxicos de T4C sobre camundongos Balb/c não infectados.
- Avaliar o efeito de T4C sobre a expressão gênica de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em tecidos de camundongos infectados.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas das linhagens Balb/c entre 6 a 12 semanas de idade, do Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB, USP. Esses animais foram mantidos à temperatura ambiente regulada com acesso livre a ração e água (*ad libitum*). Todos os procedimentos laboratoriais envolvendo animais foram previamente autorizados pela Comissão de Ética em Uso de Animais para experimentação do ICB-USP (Protocolo 067, Fls 58, Livro 02).

#### **3.2 Obtenção e manutenção das cepas de *T. cruzi***

##### *3.2.1 Formas tripomastigotas sanguícolas*

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), isolada por Silva e Nussenzweig (1953), possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoces. Esta cepa é altamente virulenta e patogênica, causando alta mortalidade e lesões tissulares graves (Scorza e Scorza, 1972; Silva e Nussenzweig, 1973). Juntamente com a linhagem de camundongos Balb/c representam um modelo amplamente aceito para o estudo da infecção aguda da doença de Chagas. A cepa Y de *T. cruzi* foi mantida por meio de repiques semanais em camundongos da linhagem Balb/c. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com formas tripomastigotas sanguícolas (1.000 parasitas/animal). A cada semana, o sangue contendo formas tripomastigotas foi obtido por punção cardíaca na presença de heparina 5.000 UI (Liquemine Roche), ou solução anticoagulante (citrato de sódio 1,78 %, ácido cítrico 0,63 % e glicose anidra 3 % diluídos em água *milliQ*), após anestesia dos animais infectados.

##### *3.2.2 Formas epimastigotas*

As formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa CL, clone 14 (Brenner e Chiari, 1963) foram mantidas em fase exponencial de crescimento em meio LIT (Liver Infusion–Tryptose) pH 7,2,

que contém infusão de fígado 5,0 g/L, Triptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCL 0,4 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,0 g/L, glicose 2 g/L, hemina 10 g/L suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 28 °C (Camargo, 1964).

### **3.3 Infecção e tratamento**

#### *3.3.1 Ensaio de infecção e administração única de T4C*

Os animais foram infectados com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas por via intraperitoneal (i.p.). Após 1 hora, receberam pela mesma via tampão fosfato salino (PBS) – grupo controle – ou o ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico (T4C) diluído em PBS, num volume final de 200 µl. As doses testadas variaram entre 30 a 200 mg/kg.

#### *3.3.2 Ensaio de infecção e administração prolongada de T4C*

Os animais foram infectados por via i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas. Após 6 horas, receberam pela mesma via a primeira dose de PBS (grupo controle) ou T4C diluído em PBS, num volume final de 200 µl. Os animais foram tratados durante 10 dias de 12 em 12 horas, utilizando-se doses 10 ou 40 mg/Kg dia.

O efeito da dose única ou prolongada de T4C sobre a infecção de camundongos foi avaliado quanto aos seguintes parâmetros: (a) parasitemia; (b) sobrevida; (c) parasitismo tecidual e eventualmente (d) expressão gênica de citocinas sob o tratamento concomitante à infecção, como descrito mais adiante.

### **3.4 Avaliação da parasitemia e sobrevida**

Amostras de sangue foram obtidas da veia caudal dos animais, entre o 5º e 15º dia depois da infecção (d.p.i.), o que corresponde à fase aguda da doença. A cada dia a parasitemia foi determinada em 10 µL contando-se o número de parasitas móveis em 25 campos do microscópio de luz (Nikon Eclipse E200) utilizando-se um aumento de 400x (Brener, 1962). A sobrevida dos animais foi acompanhada durante 40 d.p.i.

### **3.5 Determinação da DL<sub>50</sub> da cepa Y de *Trypanosoma cruzi***

A fim de determinar o valor do inóculo utilizado neste trabalho (500 formas de tripomastigotas sanguícolas em camundongos Balb/C) em unidades de DL<sub>50</sub>, foi feito um ensaio de infecção por via i.p. com três tamanhos de inóculos diferentes: 500, 750 ou 1000 formas de tripomastigotas sanguícolas. Foram avaliadas a parasitemia e a mortalidade, e então, o valor de DL<sub>50</sub> foi obtido.

### **3.6 Avaliação dos indicadores de efeitos tóxicos de T4C**

Animais não infectados que receberam tratamento de dose única ou prolongada de T4C ou ainda, PBS (controle), foram acompanhados por 40 dias. Os parâmetros avaliados ao longo desse tempo foram peso corporal (FX – 1200i, AND A&D Company) e sobrevida.

### **3.7 Técnica histológica e análise da carga parasitária**

O parasitismo tecidual foi avaliado através da contagem aleatória do número de ninhos de amastigotas observados em 20 campos microscópicos, utilizando-se um aumento de 400x (Castro e Brener, 1985). Para isso, no 15º d.p.i., amostras de baço, bexiga, coração, intestino, músculo esquelético e pulmão foram coletadas de animais controles e tratados. Os órgãos foram transferidos para o formaldeído 10% diluídos em tampão PBS, e então processados por desidratação gradual em soluções de etanol, seguida de imersão em xileno, e posteriormente emblocados em parafina. Secções de tecido de 5 µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia de luz.

### **3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa e análise da carga parasitária**

Para confirmar os dados de carga parasitária nos seis tecidos citados acima, foi adaptada da literatura (Cummings e Tarleton, 2003) uma técnica de PCR em tempo real, com o propósito de quantificar o número de parasitas equivalentes a 5 ng de DNA genômico (DNAg) proveniente de cada tecido já citado. Para isso, foi escolhido o método “quantificação absoluta baseada na

utilização de uma curva-padrão”. A vantagem do uso desse método é que não há necessidade que a eficiência da amplificação do gene alvo e do controle endógeno sejam equivalentes. Entretanto, foi necessário utilizar a cada corrida, uma curva padrão.

### 3.8.1 Extração de DNAg de tecidos

No 15° d.p.i., amostras dos seis órgãos foram retiradas dos camundongos de cada grupo experimental, para extração de DNAg, que foi realizada utilizando-se o “kit” “*Dnaeasy Blood and Tissue Kit*” conforme especificações do fabricante (Quiagen). A concentração de DNAg das amostras foi estimada por espectrofotometria e ajustada a uma concentração final de 2,5 ng/μL. Alternativamente, a concentração de DNAg foi determinada por espectrofotometria (leitura das absorbâncias a 260 e 280 nm) em aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000).

### 3.8.2 Construção das curvas-padrão para PCR quantitativa (PCRq)

Para construção da curva-padrão foi extraído DNAg (como descrito acima) de 25 mg de cada tecido previamente contaminado artificialmente com  $5 \times 10^5$  epimastigotas da cepa CL-14 de *T. cruzi*. Uma vez ressuspendido, o DNAg foi seriadamente diluído a um fator de 1:10, com 2,5ng/μl de DNAg proveniente de tecidos de camundongos sem infecção. O limite de detecção observado foi de aproximadamente 0,5 parasita equivalente/25 mg de tecido, sendo compatível com os limites de detecção relatados na literatura (Cummings e Tarleton, 2003).

### 3.8.3 PCR em tempo real ou PCRq

Cada unidade de reação conteve 5 ng de DNAg, 0,5 μM de primers específicos de *T. cruzi* TCZ direto 5’-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3’, e TCZ reverso 5’-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3’(Bioneer; Bioneer Corporation; Daedeok-gu, Daejeon, Korea do Sul), (onde M corresponde aos nucleotídeos A ou C), 10μL de *Sybr Green Master Mix* (Fermentas®; Fermentas Canada Inc; Burlington, Ontário, Canadá) e Água *Nuclease-free* (Fermentas®), num volume final de 20 μL. Esses *primers* amplificam um produto de 182 pares-

de-bases. Paralelamente, como controle normalizador para cada amostra, foi feita uma reação com *primers* específicos para fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) murino: TNF-5241 direto 5'–TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA–3' e TNF-5411 reverso 5'–CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC–3' (Bioneer) numa concentração de 0,5  $\mu$ M. As placas contendo as reações foram transferidas para o termociclador *Eppendorf RealPlex 2/2*. A fase de amplificação foi dividida em 3 etapas e submetida a 40 ciclos: 95 °C por 10 segundos, 63 °C por 15 segundos e 72 °C por 8 segundos. A última fase foi a construção da curva de desnaturação (95 °C por 1 segundo, 60 °C por 30 segundos e 90 °C por 1 segundo).

#### 3.8.4 Tratamento de dados

A quantificação absoluta baseada na utilização da curva-padrão foi o método escolhido para análise dos dados. Os valores de *Ct* (Cycle threshold) obtidos pelo *software Eppendorf RealPlex 2/2* versão 1.5 foram transformados em números de parasitas equivalentes ( $P_E$ ) a 5 ng de DNA de tecido murino e suas médias foram corrigidas de acordo com os produtos de TNF- $\alpha$  (Cummings e Tarleton, 2003), como descrito abaixo:

Mediante o uso da curva padrão, foram obtidos os números de  $P_E$  a 5 ng de DNA tecidual em escala logarítmica (utilizando *primers* TCZ ou TNF- $\alpha$ ) por meio da fórmula abaixo:

$$y = mx + b$$

Sendo que:

m = inclinação da curva;

b = Y na origem;

x = variável (*Ct*).

Os valores obtidos até aqui (tanto para os produtos de TCZ quanto para TNF- $\alpha$ ) foram retornados a números reais de  $P_E$  a 5 ng de DNA tecidual, elevando a cada valor obtido à base 10. Tendo os números reais de  $P_E$  a 5 ng de DNA tecidual para os dois pares de *primers*, foram feitas as normalizações, como descrito abaixo:

Todos os valores (números reais de  $P_E$  a 5 ng de DNA tecidual) obtidos para o produto de TNF- $\alpha$  foram divididos pelo maior valor do produto desse mesmo par de *primer*. A razão obtida

aqui para cada amostra foi multiplicada respectivamente para cada valor (números reais de  $P_E$  a 5 ng de DNA tecidual) do produto de TCZ. Finalmente, as médias e o erro padrão foram determinados para cada grupo experimental, a partir dos valores obtidos aqui.

### **3.9 Análise de expressão gênica das citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-10 (IL-10) em tecidos**

A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em tecidos foi avaliada por meio da técnica PCR quantitativa - via Transcriptase Reversa (RT-PCR $q$ ). Para análise dos dados foi escolhido o método de  $\Delta\Delta C_t$  comparativo, no qual se obtém a razão de expressão gênica entre o gene alvo de tecidos de animais tratados e não tratados. A seqüência do gene codificante para  $\beta$ -actina foi usado como normalizador para os ensaios de expressão gênica.

O método comparativo é usado para medir diferenças de expressão de um RNA mensageiro entre amostras experimentais. Tipicamente, este ensaio é usado quando se investigam diferenças na expressão gênica de animais selvagens e nocautes ou transgênicos, ou entre amostras-tratadas e controles. Os resultados são expressos como “razão de expressão” relativa ao calibrador (animais não tratados). O método  $\Delta\Delta C_t$  é aplicável apenas quando os *primers* específicos ao gene de interesse e gene referência endógeno demonstram ter curvas-padrão com coeficientes máximos, indicando máxima eficiência de amplificação (valores -  $3.3 \pm 0,1$ ;  $R^2 \geq 0,99$ ). Nessas condições, os *primers* terão 100% de eficiência e as amplificações serão consideradas comparáveis.

#### *3.9.1 Extração de RNA total de tecidos*

Amostras de coração, baço e intestino foram retiradas dos animais que receberam tratamento prolongado, no 10 d.p.i. Os tecidos (50 a 100 mg) foram macerados e então, homogeneizados na presença de 1 mL de Trizol. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio às amostras sendo incubadas por mais 3 minutos. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a  $12.000 \times g$  a  $4^\circ C$  por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi recuperada sendo adicionado à ela 0,5 mL de isopropanol, e então incubadas por 10 minutos. Seguiu-se 10 minutos de centrifugação  $12.000 \times$

g à 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao sedimento 1 mL de etanol 75%. Os tubos novamente foram centrifugados, desta vez a 7.500 x g por 7 minutos a 4 °C. Finalmente, os sedimentos contendo o RNA purificado foi ressuspensionado em 30 µL de água livre de ribonucleases (DEPC). As amostras de RNA foram tratadas com DNase, com a finalidade de eliminar possíveis contaminações das amostras com DNA. A ausência de contaminação com DNA foi ainda confirmada por PCR das amostras de RNA tratadas (ausência de produto de amplificação). A concentração de RNA das amostras foi determinada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop como descrito anteriormente para DNA.

### 3.9.2 Teste de eficiência dos primer *IFN-γ*, *IL-10* e *β-ACT*

Antes de avaliar a expressão gênica das citocinas, foi necessário certificar-se que os três pares de *primers* escolhidos amplificassem as amostras de cDNA com a mesma eficiência. A eficiência é dependente de diversos fatores tais como, qualidade dos *primers*, diluição e a variabilidade das condições na corrida de PCR. O valor de inclinação da curva que é fornecido com a construção da curva-padrão, não necessita exatamente ser  $-3,3 \pm 0,1$ . Neste caso, a inclinação da curva, gerada pelo par de *primers* teste, deve corresponder à inclinação da curva do par de *primers* normalizadores (gene referência endógeno) para a mesma amostra de cDNA padrão dentro do desvio padrão  $\pm 0,1$ . Por exemplo, se o par de *primers* teste gerar uma inclinação da curva de -3,6 e o par de *primers* referência uma inclinação da curva de -3,5 para o mesmo cDNA padrão usado, então o teste está validado. Entretanto, se o par de *primers* normalizadores gerar uma inclinação da curva de -3,3 e o par de *primers* teste uma inclinação da curva de -3,6, o teste está invalidado (Bookout et al., 2005). Para isso foram feitas três curvas-padrão uma para cada par de *primers*.

### 3.9.3 Padrões de calibração quantitativa

Para se obter padrões quantitativos para cada gene de interesse, foram feitas clonagens dos genes de cada citocina como descrito abaixo, e estocados a  $-20$  °C.

a) *Amplificação e purificação de fragmentos de DNA complementar e ligação*

Amostras de DNA complementar (cDNA) ao RNA mensageiro (mRNA) de tecidos de animais infectados foram submetidas a PCR usando os três pares de *primers* IFN- $\gamma$ , IL-10 e  $\beta$ -ACT. Posteriormente, as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2,0 %, e então, o DNA correspondente as bandas de interesse foram purificadas mediante o uso do sistema “*NucleoSpin®ExtractIF*” (Macherey-Nagel GmbH & Co KG; Düren, Nordrhein-Westfalen, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante. Para clonagem em vetor bacteriano, nas reações de ligação foram usados o vetor *pGEM-T-Easy®* (Promega Corporation; Madison, WI, Estados Unidos), o fragmento de DNA, empregando-se a razão molar inserto:vetor equivalente a 3:1, a enzima T4 DNA ligase (1U/ $\mu$ l, Fermentas®) em tampão nas condições recomendados pelo fabricante. Em todos os casos, o volume de reação total foi utilizado para transformar as células de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ), como descrito logo abaixo. Os clones obtidos aqui contendo o fragmento de DNA foram submetidos a seqüenciamento como descrito mais adiante (item d).

b) *Transformação de bactérias competentes*

▪ *Bactérias E. coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas foram crescidas a 37 °C em meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10 g/L, com pH de 7,5) líquido ou sólido, suplementadas quando necessário com os antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (50  $\mu$ g/ml) para seleção de colônias portadoras de plasmídeo com marca de resistência, 20  $\mu$ g/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -galactopiranosídeo) e 1 mM de IPTG (Isopropil  $\beta$ -galactopiranosídeo) para seleção de colônias sem atividade  $\beta$ -galactosidase (brancas).

▪ *Preparação de bactérias competentes*

Na preparação das bactérias competentes para a transformação, uma colônia de bactéria (*E. coli* DH5- $\alpha$  ou BL21-Codon Plus (DE3)-RIL) foi inoculada em 5 mL de meio LB (sem antibiótico) e cultivada a 37 °C por 16 horas com agitação. No dia seguinte a cultura crescida foi diluída 1:100 em meio LB e incubada nas mesmas condições anteriores até atingir uma densidade ótica (DO<sub>600</sub>) entre 0,5 e 0,6. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e lavadas com 500 mL de água milli-Q estéril gelada. O sedimento obtido foi homogeneizado em 50 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e incubado por aproximadamente 1 hora em gelo. Em seguida a suspensão celular foi centrifugada a 3.000

x g por 15 minutos a 4 °C e o sedimento celular homogeneizado com 2 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. As células competentes foram usadas imediatamente ou estocadas a -70 °C em presença de glicerol 20% (v/v).

▪ *Transformação*

As alíquotas das suspensões de células competentes (100 µL) foram descongeladas em gelo, transferidas para tubos de ensaio estéreis e incubadas com os produtos de ligações por 30 minutos. Em seguida as células foram submetidas a choque térmico (42 °C por 2 minutos) e imediatamente incubadas em gelo por mais 10 minutos. Após a recuperação das células em meio LB por 1 hora a 37 °C com agitação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o respectivo antibiótico e/ou IPTG e X-Gal para seleção das colônias recombinantes. As bactérias contendo o plasmídeo (produto das ligações) foram crescidas em um pré-inóculo a 37 °C em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/ml) por 16 horas. O pré-inóculo foi diluído 1:100 no mesmo meio e incubado a 37 °C, sob agitação até a cultura atingir uma DO de 0,6.

c) *Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep)*

Os DNAs plasmidiais dos clones obtidos nas transformações de células de *E. coli* (DH5α) foram extraídos pelo método de lise alcalina, como descrito por Sambroock *et al.* (1989). Uma colônia de bactéria recombinante cultivada a 37 °C por 16 horas em 2 mL de meio LB com o antibiótico adequado foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos e homogeneizada em 300 µL de solução I (Tris-HCl 25 mM; glicose 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) contendo RNase A 100 µg/mL. Em seguida foram adicionados 300 µL de solução II (hidróxido de sódio 0,2M; SDS 1%) misturando-se delicadamente. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram acrescentados 300 µL de solução III (ácido acético glacial 5 M; acetato de potássio 3 M) e a suspensão misturada por inversão e incubada por 30 minutos no gelo. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 6.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante recuperado foi precipitado com 400 µL de isopropanol e novamente centrifugado a 6.000 x g por 20 minutos. O precipitado formado foi lavado com 600 µL de etanol 70% gelado, submetido a nova centrifugação, seco e solubilizado em 30 µL de tampão TE. A integridade do DNA foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio.

#### d) *Seqüenciamento de DNA*

As reações de seqüenciamento foram realizadas pelo Método de Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando o oligonucleotídeo M13 direto e o *kit* de seqüenciamento de DNA *BigDye™ 3.1* (Applied Biosystems; Life Technologies Corporation; Carlsbad, CA, Estados Unidos) segundo instruções do fabricante. As reações foram resolvidas num seqüenciador automático *ABI 3100* (Applied Biosystems). Os alinhamentos e comparações entre as seqüências foram realizados mediante o uso dos programas *Align versão 6.2.0*, *BLAST versão 2.2.19 (NCBI)*, *BioEdit versão 7.0.0*.

#### 3.9.4 *PCR quantitativa - via Transcriptase Reversa*

Após a extração de RNA foram realizadas as sínteses de cDNAs, utilizando 3 µg de RNA total previamente tratado com DNase, 200 U de transcriptase reversa *SuperscriptII* (Invitrogen; Life Technologies Corporation; CA, Estados Unidos), 50 ng de oligonucleotídeos (hexâmeros aleatórios) ou 250 ng de oligo-dT, 2,5 mM de dNTPs, 10 mM de DTT, 40 U de RNase *OUT* e tampão 1X da transcriptase reversa, segundo instruções do fabricante (Invitrogen). Os cDNAs obtidos foram diluídos em água *milli-Q* numa concentração final por volta de 10 ng/µL. Em seguida, foram realizadas as reações de *RT-PCRq* utilizando 3,2 pmoles de oligonucleotídeos murinos: IFN- $\gamma$  direto 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' e reverso 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' (produto final: 92 pares-de-bases); IL-10 direto 5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3' e reverso 5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3' (produto final: 191 pares-de-bases); e como *primers* normalizadores  $\beta$ -ACT direto 5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3' e reverso 5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3' (produto final: 81 pares-de-bases), 50-100 ng de cada cDNA como molde e 5 µL de *SYBR Green* (Fermentas), sob os seguintes parâmetros: 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 15 segundos. A curva de dissociação foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 1 segundo; 60 °C por 30 segundos e 90 °C por 1 segundo.

### 3.9.5 Tratamento de dados

Os dados foram obtidos pelo *software Eppendorf RealPlex 2/2 versão 1.5* e analisado pelo método de  $\Delta\Delta Ct$  comparativo no qual obtêm-se a razão entre a expressão do gene alvo de tecidos de animais tratados e os não tratados. Para isso, primeiramente, foi obtida a razão relativa da abundância de transcritos do gene IFN- $\gamma$  e IL-10 em relação ao normalizador ( $\beta$ -ACT), que foi calculada através da diferença entre as médias dos *Ct*'s do gene alvo e a média dos *Ct*'s do gene normalizador, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene normalizador.}$$

Posteriormente, foi obtida a razão entre a expressão do gene alvo de tecidos de animais tratados e os não tratados, através da seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ grupo tratado com T4C} - \Delta Ct \text{ grupo não tratado}$$

Já que o valor de *Ct* é proporcional ao logaritmo da quantidade do gene alvo presente nas amostras (Pfaffl, 2001), o valor final foi dado através seguinte fórmula aritmética:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.10 Análises de dados e estatísticas

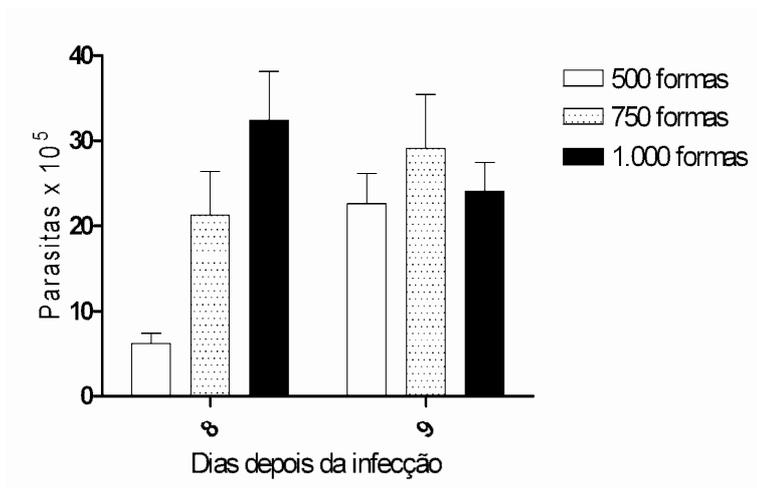
Os dados foram inseridos em gráficos utilizando-se o programa computacional *GraphPad Prism versão 4.0, GraphPad Software*. Para analisar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os dados obtidos pelos grupos experimentais, foi utilizada a análise de variância: *One-Way ANOVA* e *Tukey post-test*. Para analisar os dados de sobrevida foi utilizado

o teste estatístico *Logrank-test*. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes, exceto que outro valor seja explicitamente indicado

## 4 RESULTADOS

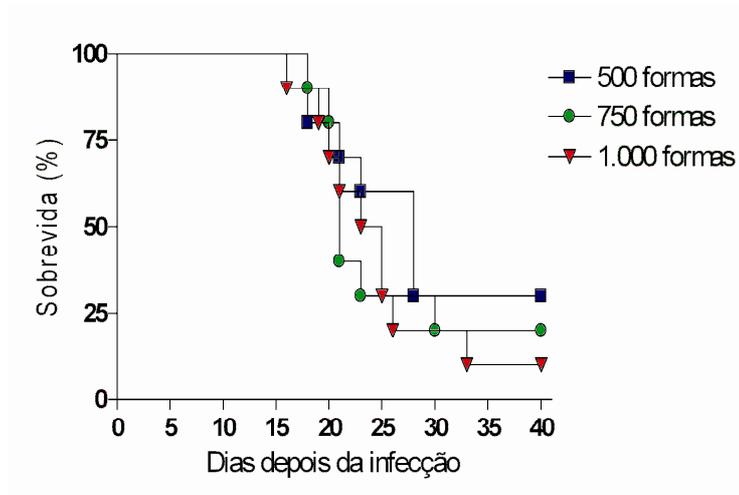
### 4.1 Determinação da Dose-Letal 50 % (DL<sub>50</sub>) da cepa Y de *T. cruzi*

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* possui picos parasitêmicos precoces, sendo altamente virulenta e patogênica, e produzindo uma alta mortalidade e lesões tissulares graves (Scorza e Scorza, 1972). Portanto, essa cepa, junto à linhagem de camundongo Balb/c (o modelo experimental escolhido) torna-se ideal para o estudo de infecção chagásica aguda. A escolha do tamanho do inóculo (quantidade de tripomastigotas viáveis) é crucial, pois determina qual dia será o pico parasitêmico e o momento da mortalidade. Além disso, o número de parasitas inoculados pode determinar a eficácia de uma droga em estudo. Para isso, foi feito um ensaio de infecção em camundongos com diferentes tamanhos de inóculos, a fim de determinar a quantas DL<sub>50</sub> corresponde uma infecção por 500 formas de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y (tamanho de inóculo escolhido para este estudo). Os animais que receberam 500 ou 750 formas de tripomastigotas sanguíneas tiveram o pico da parasitemia no 9º d.p.i., correspondendo a  $22,57 \pm 3,51$  e  $29,13 \pm 6,26 \times 10^5$  parasitas/mL, respectivamente, enquanto que, os animais infectados com 1.000 formas apresentaram o pico da parasitemia no 8º d.p.i., com  $32,36 \pm 5,81 \times 10^5$  parasitas/mL (Figura 6).



**Figura 6. Picos parasitêmicos em camundongos Balb/C infectados i.p. com 500, 750 ou 1.000 formas de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os picos ocorrem nos dias 8 ou 9 p.i. (N = 5)**

Nenhuma das doses testadas matou 100 % dos camundongos. Os animais que receberam 500, 750 ou 1.000 formas tiveram 70, 80 e 90 %, respectivamente, de mortalidade (Figura 7). Uma vez que as três doses avaliadas mostraram ser subletais, pode ser dito que são aptas para ensaios de infecção no qual se avalie o efeito de drogas anti-*T. cruzi*. Portanto, em nossos experimentos foram utilizadas como dose de infecção 500 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y, o que corresponde a um DL<sub>50</sub> de 1,7.

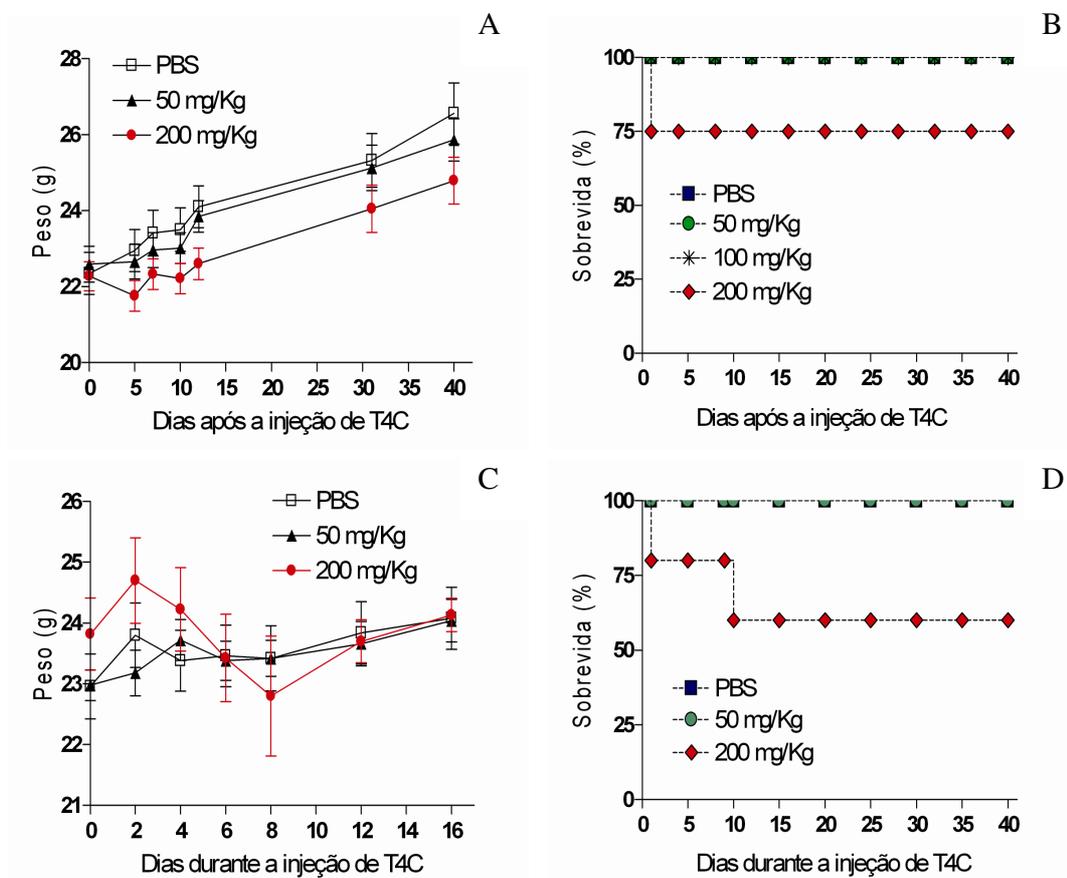


**Figura 7. Curva de mortalidade de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500, 750 ou 1.000 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. (N = 5).**

#### 4.2 Ensaios de toxicidade de T4C

T4C é uma droga que pode resultar em toxicidade em mamíferos. Em uma revisão feita por Gosálvez, (1983) estão descritos os efeitos inibitórios de T4C sobre células de mamíferos, tal como a inibição da síntese protéica (Gosalvez, 1983). Um trabalho prévio (Knowles e Ballard, 1978) também demonstrou o mesmo efeito em reticulócitos. Muitos trabalhos relatam seu efeito antioxidante que melhora várias funções fisiológicas em diferentes modelos animais (Miquel et al., 1982; Suo et al., 2006; Navarro et al., 2007; De La Fuente e Miquel, 2009), no entanto, T4C pode ser tóxico devido a que, pode ser hidrolisado em cisteína e formaldeído, sendo esse último o responsável, pela toxicidade (Gosalvez, 1983).

Foram avaliados parâmetros indicadores dos efeitos tóxicos do T4C sobre camundongos não infectados, por meio do acompanhamento de peso corporal e sobrevida. Em média o peso corporal inicial de cada camundongo foi de  $22,4 \pm 1,4$  gramas. As maiores diferenças de peso entre os animais tratados com dose única (200 mg/Kg) e o controle ocorreram no 12º dia após a injeção da droga. Neste dia o grupo não tratado e os tratados com T4C nas doses de 50 e 200 mg/Kg apresentaram um aumento de 7,9 %, 5,6 % e 1,4 % de peso corporal, respectivamente (Figura 8A). Além disso, T4C na dose de 200 mg/Kg levou à morte a 20% dos camundongos, um dia após a sua administração (Figura 8B). Não foi observada mortalidade em animais tratados a doses menores até o final do experimento. Quando administrado por período prolongado (10 dias) T4C reduziu progressivamente o peso de animais tratados com a maior dose (Figura 8C) e diminuiu 40% a sobrevida em relação ao grupo controle (Figura.8D).



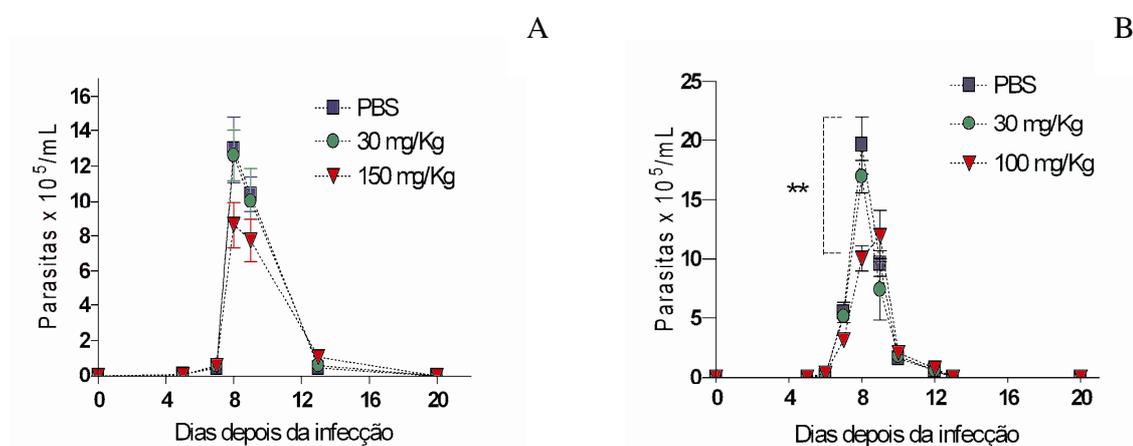
**Figura 8. Peso corporal e curva de mortalidade de camundongos Balb/C não infectados e tratados com dose única ou prolongada de T4C.** A, C: Peso corporal de animais tratados com dose única (n=10) ou prolongada (n=5), respectivamente; B, D: Curva de mortalidade de animais que receberam dose única (n=5) ou prolongada (n=5). Animais que receberam apenas o veículo (PBS) constituem o grupo controle em todos os experimentos.

### 4.3 Infecção e tratamento com T4C em dose única

#### 4.3.1 Parasitemia e sobrevivida

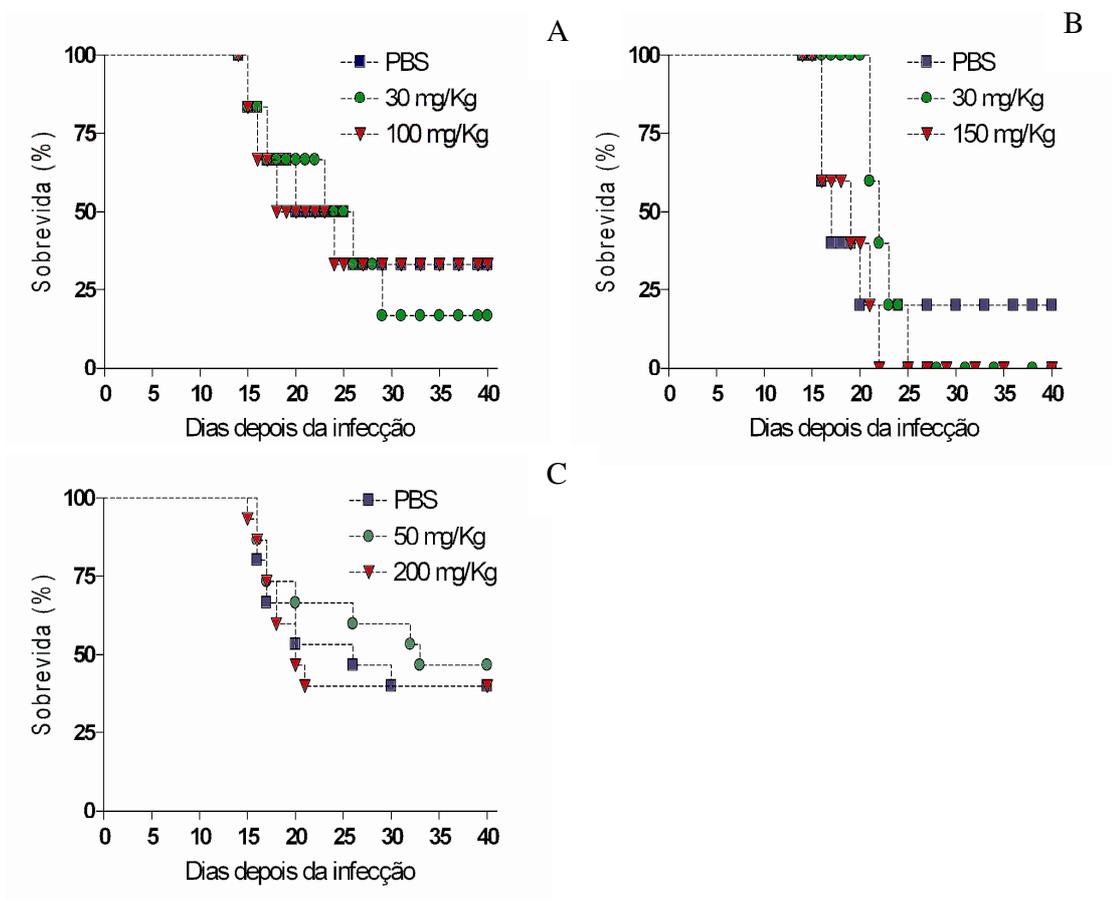
Uma vez que, os três tamanhos de inóculo (500, 750 e 1.000 formas de tripomastigotas sanguícolas) mostraram ser subletais, pode ser dito que são aptos para ensaios de infecção no qual se avalie o efeito de drogas anti-*T. cruzi*. Portanto, para avaliar o efeito de T4C sobre a infecção de camundongos Balb/C pelo *Trypanosoma cruzi*, foram utilizadas em nossos experimentos 1,7 DL<sub>50</sub> de tripomastigotas sanguícolas (500 formas). O pico da curva

parasitêmica em experimentos independentes variou entre os dias 8 e 9 pós-infecção (p.i.) Os animais que receberam T4C nas doses 30 ou 50 mg/Kg não apresentaram diminuição do pico da parasitemia quando comparados ao grupo dos animais que receberam apenas PBS (controle). No entanto, os animais que receberam T4C na dose de 100 mg/Kg apresentaram redução de 48,8% (figura 9B), sendo essa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0.01$ ). Apesar da redução de 40,7 % (figura 9A) no pico da parasitemia de animais que receberam 150 mg/Kg, o teste estatístico usado na análise dos resultados (ANOVA de uma via e post-test de Tukey) não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle.



**Figura 9. Evolução da curva parasitêmica em camundongos Balb/C infectados i.p. com 500, formas de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados i.p. com dose única de T4C. A: Animais infectados e tratados com 30 ou 150 mg/Kg (N = 5); B: Animais infectados e tratados com 30 ou 100 mg/Kg (N=6). \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .**

Em relação com a sobrevivência dos animais tratados e controles, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre eles (Figura 10). Embora a maioria de nossos resultados mostre uma maior sobrevivência de animais tratados com doses baixas (30 ou 50 mg/Kg) (Figuras 10B e 10C), o teste estatístico escolhido (Logrank Test) não mostrou significância. Entretanto, quando comparamos a sobrevivência de animais que receberam 150 mg/Kg e 30 mg/Kg, vimos uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,02$ ) (Figura 10B).



**Figura 10.** Curva de mortalidade de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com dose única de T4C. A: Animais infectados e tratados com 30 ou 100 mg/Kg (N=6). B: Animais infectados e tratados com 30 ou 150 mg/Kg (N = 5). C: Animais infectados e tratados com 50 ou 200 mg/Kg (n=15).

#### 4.3.2 Avaliação da carga parasitária em tecidos

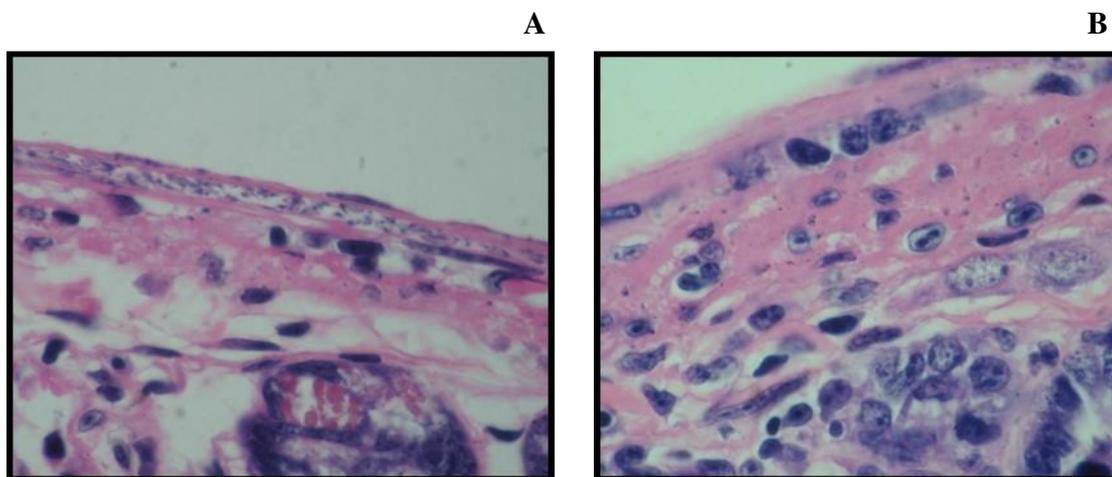
##### (a) análise histológica

Diferenças na distribuição da carga parasitária em tecidos podem desempenhar um papel importante na patogenia da doença de Chagas. Trabalhos clássicos demonstram a existência de cepas de *Trypanosoma cruzi* com diferentes tropismos para diferentes tecidos (Vianna, 1911; Campos, 1927; Taliaferro e Pizzi, 1955; Bice e Zeledon, 1970; Andrade e Macedo, 1973; Hanson e Roberson, 1974). Somente em 1978, Melo e Brener realizaram um estudo sistemático

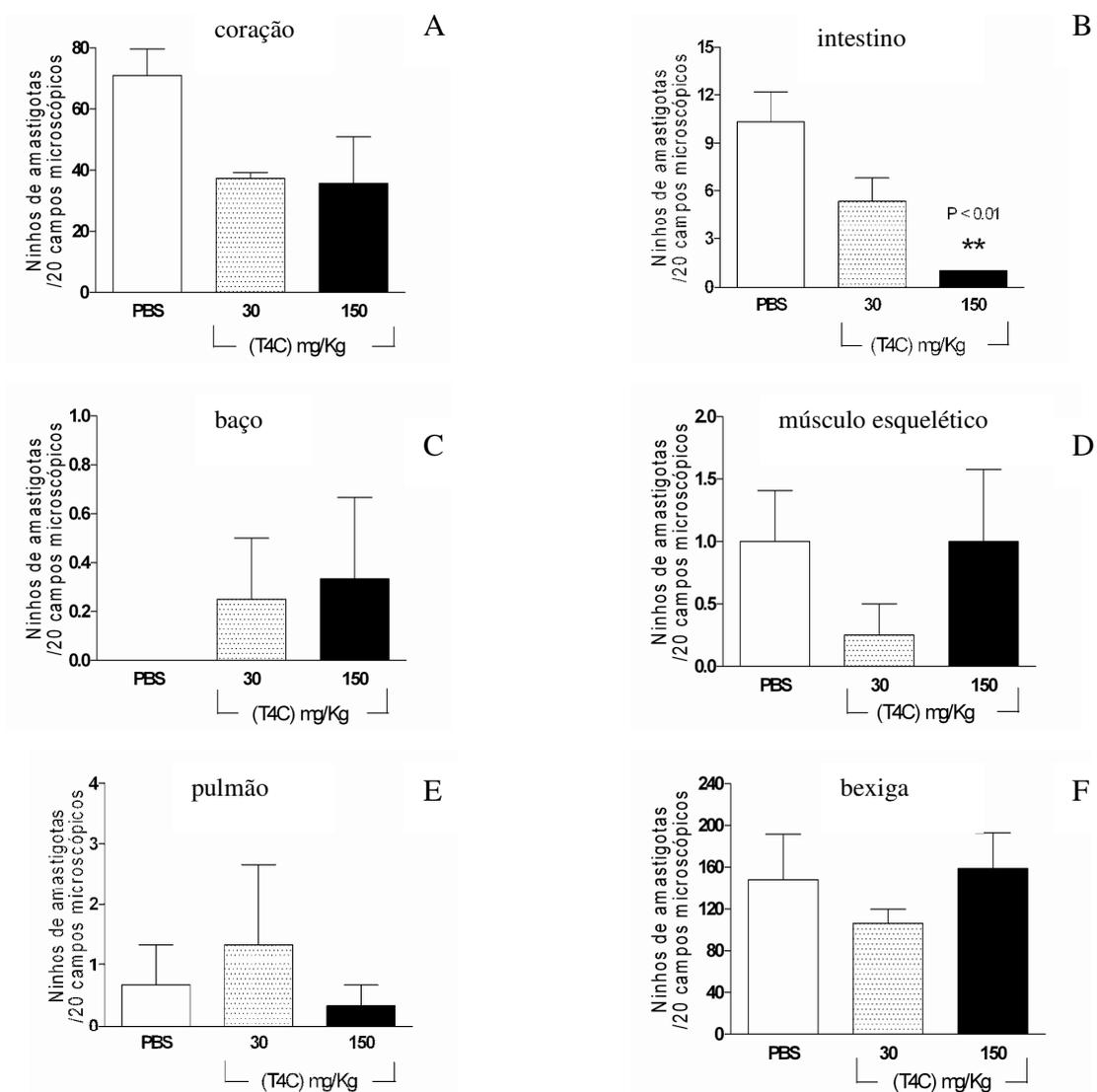
da distribuição de parasitas intracelulares em tecidos, nos quais grupos de camundongos foram inoculados com diferentes cepas. Os autores encontraram diferentes intensidades da carga parasitária em diferentes tecidos, tais como, baço, fígado, medula óssea, bexiga, pulmão, coração, músculo esquelético, intestino e dentre outros analisados, de animais inoculados com a cepa Y (Melo e Brener, 1978). A avaliação da carga parasitária é um parâmetro importante para avaliar efeitos curativos em determinados órgãos. Para isso, foi avaliado o efeito de T4C sobre a carga parasitária em seis órgãos: coração, intestino, baço, músculo esquelético, pulmão e bexiga, por meio de análise histológica (método H&E).

A distribuição de ninhos de amastigotas encontrada nos diferentes órgãos em camundongos não tratados mostrou que a maior carga parasitária foi encontrada na bexiga, apresentando  $158,8 \pm 34,16$  ninhos de amastigotas em 20 campos microscópicos (aumento 400x). Já o baço apresentou a menor carga parasitária (os valores variaram entre 0 e 1 ninho de amastigota por camundongo). De todos os órgãos analisados, o intestino de animais tratados com T4C apresentou uma diminuição estatisticamente significativa no número de ninhos de amastigotas quando comparados ao grupo controle. Foram encontrados nos intestinos de animais controles  $10,3 \pm 1,8$  ninhos e apenas  $1 \pm 0,005$  ninho de amastigotas em animais tratados com 150 mg/Kg, com redução de 90,3% ( $p < 0,01$ ). Já aqueles que receberam a menor dose da droga, apresentaram  $5,3 \pm 1,4$  ninhos de amastigotas, sendo esta diferença não significativa, quando comparados ao grupo controle (Figuras 11 e 12B). No coração, o grupo que recebeu a dose menor da droga (30 mg/Kg) apresentou uma redução de 47,4 % no número de ninhos de amastigotas, enquanto que, os animais tratados com a maior dose de T4C tiveram uma redução de 49,8% em relação ao grupo não tratado. No entanto, nenhum dos dois grupos tratados apresentaram diferenças significativas na carga parasitária do coração quando comparados ao grupo controle. Os números de ninhos no coração de animais controles, e tratados com 50 ou 150 mg/Kg foram:  $71 \pm 8,7$ ;  $37,3 \pm 1,8$ ;  $35,6 \pm 15,3$ , respectivamente (Figura 12A). A bexiga de animais controles apresentou  $148 \pm 43,61$  ninhos de amastigotas e dos animais tratados com 30 ou 150 mg/kg, apresentou  $106,0 \pm 13,87$  e  $158,8 \pm 34,16$  ninhos de amastigotas respectivamente, sendo que todas as diferenças observadas em relação a grupo controle nesse tecido não foram significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 12F). Não foi encontrada uma distribuição homogênea de ninhos de amastigotas no baço, músculo esquelético e pulmão, sendo muitas vezes, a média dos grupos controles menor que 1 ninho de amastigota em 20 campos

microscópicos (aumento 400x) (Figuras 12C, 12D e 12E). Portanto, nas condições descritas aqui, a avaliação do efeito de drogas sobre a carga parasitária nesses três órgãos, por meio dessa técnica, fica inviável.



**Figura 11. Histologia do intestino de camundongos Balb/C na fase aguda (15 d.p.i) da infecção experimental pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** As figuras mostram os números de ninhos de amastigotas no intestino de animais infectados com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas i.p. e tratados ou não com dose única de T4C. A: intestino de animais que receberam apenas PBS (controle); B: intestino de animais que receberam T4C na dose de 150 mg/Kg. (n=3 ou 4). Aumento utilizado para fotografia, no microscópio: 1.000x (métodoH&E).



**Figura 12. Mensuração da carga parasitária no 15 d.p.i. em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose única de T4C. A-F: Os grupos foram tratados com 30 ou 150 mg/Kg, ou apenas PBS. Os gráficos mostram os números de ninhos de amastigotas contados aleatoriamente em 20 campos microscópicos (400x), em seis tecidos de cada grupo experimental (técnica histológica H&E) (n=3 ou 4). \* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.**

### **(b) PCR em tempo real**

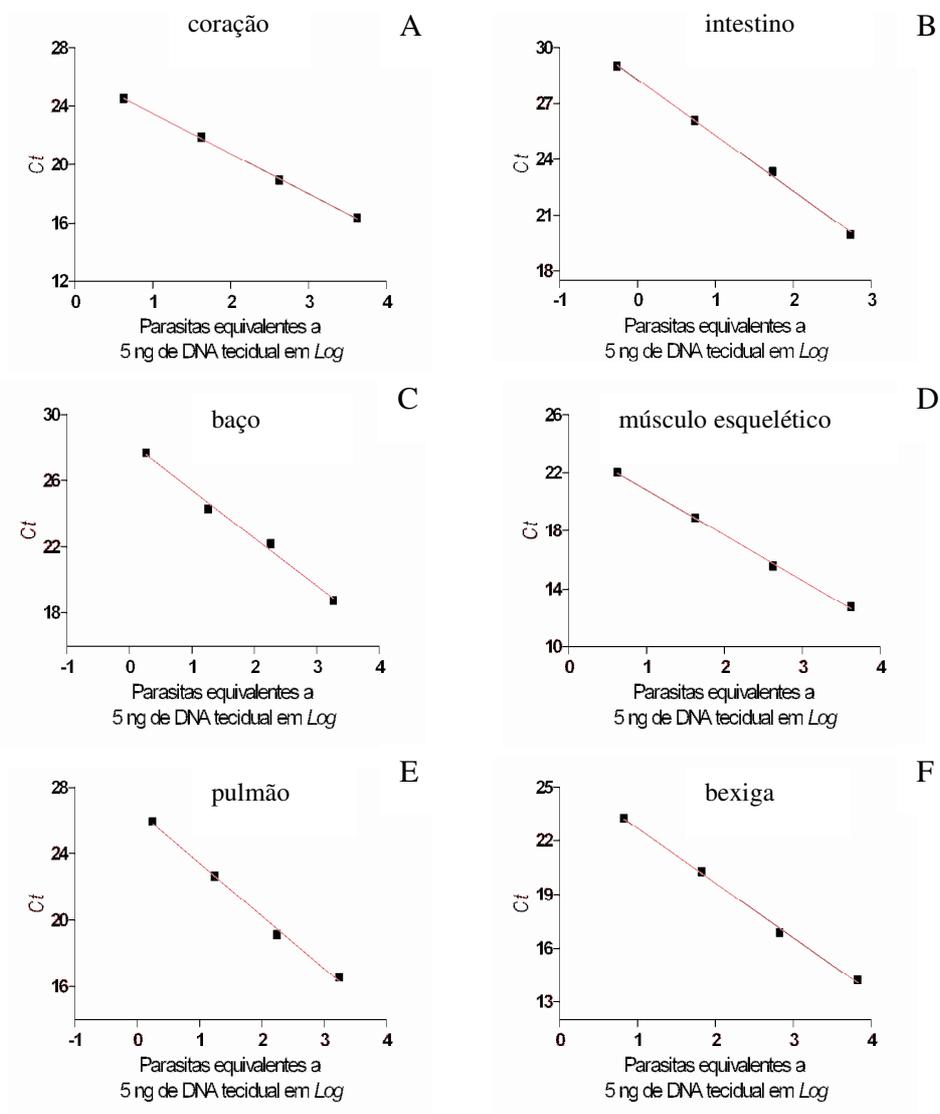
Para confirmar os dados de carga parasitária nos seis tecidos citados acima, nós adaptamos da literatura (Cummings e Tarleton, 2003) uma técnica de PCR em tempo real. Como os animais tratados com T4C na dose de 100 mg/Kg tiveram o menor pico de parasitemia dentre outras doses testadas, decidimos prosseguir testando tecidos de animais tratados com essa dose. O limite de detecção observado foi de aproximadamente 0,5 parasita equivalente/25 mg de tecido, sendo compatível com os limites de detecção relatados na literatura. Para isso, foi escolhido o método “quantificação absoluta baseada na utilização de uma curva-padrão”. A vantagem do uso desse método é que não há necessidade que a eficiência da amplificação do gene alvo e do controle endógeno sejam equivalentes. Entretanto, foi utilizada a cada corrida, uma curva padrão (Figuras 13 e 14). Os valores obtidos com análise de regressão linear, tais como os de inclinação, Y na origem e  $R^2$  utilizando os *primers* teste e normalizador estão relacionados nas tabelas 2 e 3 (valores gerados pelo *software* Graph Pad Prisma).

De acordo com a PCR em tempo real, o tecido com a menor carga parasitária (somente controles) foi o pulmão apresentando  $9,7 \pm 2,2$  parasitas equivalentes a 5 ng de DNA tecidual ( $P_E/5$  ng de DNA) (Figura 15E) e a maior carga parasitária detectada foi no coração, com  $2.797 \pm 470 P_E/5$  ng de DNA de tecido do camundongo (Figura 15A). A análise por PCR quantitativa da carga parasitária em tecidos de animais tratados com T4C confirmou os dados acima, referentes à contagem de ninhos de amastigotas no intestino. Na dose de 100 mg/Kg, T4C reduziu 91,2% ( $p < 0,01$ ) a carga parasitária no intestino quando comparados com os órgãos controles. Foram detectados  $188,6 \pm 38,51 P_E/5$  ng de DNA no intestino de animais não tratados,  $159 \pm 6,76$  e  $16,49 \pm 5,21 P_E /5$  ng de DNA no intestino de animais tratados com 30 ou 100 mg/Kg, respectivamente (Figura 15B). No coração observamos uma diferença de 54,8% na carga parasitária entre tratados com a maior dose e os controles. No entanto, de acordo com o teste estatístico essa diferença não foi significante. No coração, foram detectados  $2.797 \pm 470 P_E/5$  ng de DNA nos tecidos controles,  $2.719 \pm 456,8$  e  $1.264 \pm 70,93 P_E/5$  ng de DNA nos tratados com 30 mg/Kg ou 100 mg/Kg da droga, respectivamente (Figura 15A). Além disso, a PCR em tempo real detectou uma diminuição de 46,7% da carga parasitária no baço e 43,2 % no músculo esquelético de animais tratados com 100 mg/Kg de T4C em relação aos controles, entretando não vimos diferenças estatísticas quando comparados com seus controles respectivos. É importante notar que as diferenças encontradas para esses órgãos não foram

detectadas pelo método anterior (contagem de ninhos de amastigotas). No baço, os números de  $P_E/5$  ng de DNA foram  $52,85 \pm 6,08$ ;  $46,35 \pm 8,81$  e  $28,16 \pm 3,28$  nos animais que receberam PBS ou T4C nas doses de 30 ou 100 mg/Kg, respectivamente (Figura 15C). No músculo esquelético dos animais controles, foram detectados  $77,12 \pm 0,69$   $P_E/5$  ng de DNA, já nos animais tratados com 30 ou 100 mg/Kg, o número de  $P_E/5$  ng de DNA foi de  $103,9 \pm 21,74$  e  $43,78 \pm 12,56$ , respectivamente (Figura 15D). No pulmão dos animais controles, foram encontrados  $9,735 \pm 2,250$   $P_E/5$  ng de DNA e dos animais tratados com 30 ou 100 mg/Kg, os valores foram  $11,23 \pm 1,964$  e  $8,813 \pm 2,878$   $P_E/5$  ng de DNA (Figura 15E). Por último, na bexiga foram encontrados os seguintes valores,  $207,1 \pm 43,94$   $P_E/5$  ng de DNA para tecidos controles,  $353,9 \pm 27,56$  e  $236,4 \pm 74,72$  para tecidos de animais tratados com 30 ou 100 mg/Kg, respectivamente (Figura 15F).

**Tabela 2** – Valores de inclinação da curva, Y na origem e R<sup>2</sup> obtidos com a construção da curva-padrão utilizando *primers* específicos para *Trypanosoma cruzi* (TCZ).

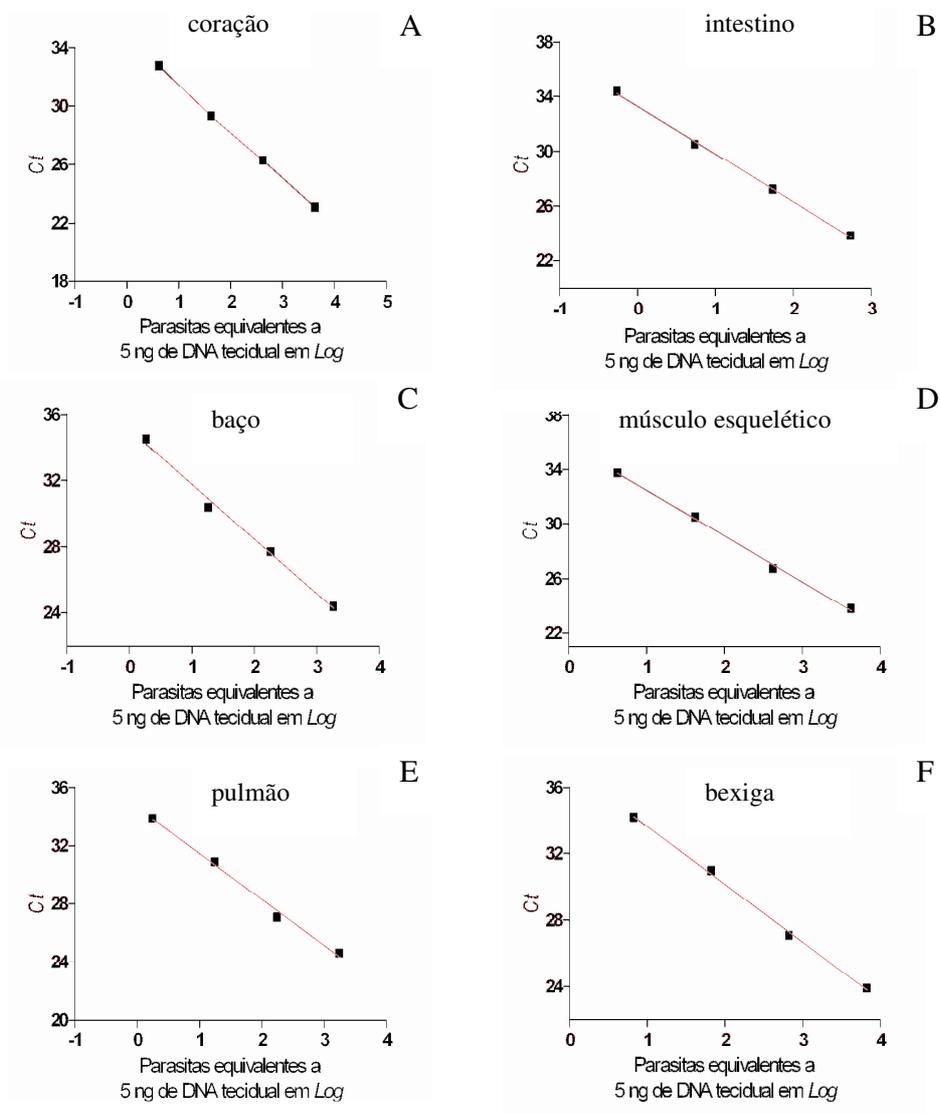
ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR	TECIDO					
	CORAÇÃO	INTESTINO	BAÇO	MÚSCULO	PULMÃO	BEXIGA
Melhores valores de Ajuste						
Inclinação da reta de regressão	-2,748 ± 0,05318	-3,004 ± 0,09038	-2,889 ± 0,1795	-3,114 ± 0,06958	-3,157 ± 0,1411	-3,055 ± 0,09662
Y na origem	26,24 ± 0,1279	28,30 ± 0,1509	28,32 ± 0,3757	23,92 ± 0,1674	26,57 ± 0,2931	25,76 ± 0,2497
X na origem	9,55	9,421	9,801	7,682	8,417	8,432
1/inclinação da reta de regressão	-0,3639	-0,3329	-0,3461	-0,3211	-0,3168	-0,3273
95% intervalos de confiança						
Inclinação reta de regressão	-2,977 a -2,519	-3,393 a -2,615	-3,661 a -2,117	-3,413 a -2,815	-3,764 a -2,550	-3,471 a -2,639
Y na origem, quando X=0,0	25,69 a 26,79	27,65 a 28,95	26,70 a 29,93	23,20 a 24,64	25,31 a 27,83	24,69 a 26,84
X na origem, quando X=0,0	8,973 a 10,23	8,474 a 10,65	8,087 a 12,75	7,185 a 8,284	7,323 a 10,02	7,687 a 9,407
<i>Grau de ajuste</i>						
r <sup>2</sup>	0,9993	0,9982	0,9923	0,999	0,996	0,998



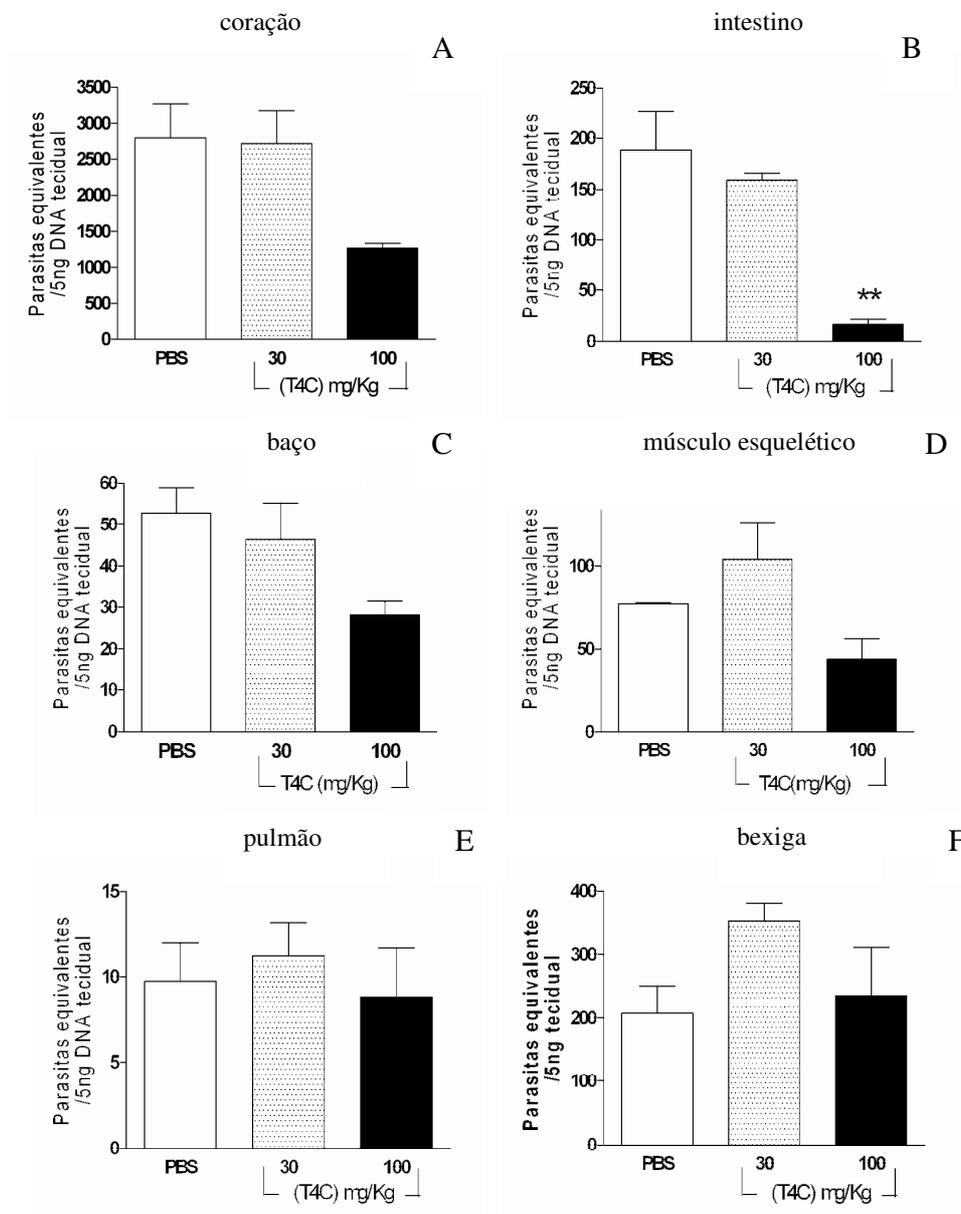
**Figura 13. Curvas de regressão linear construídas a partir de diluições seriadas à razão 1:10 de DNAg de tecidos, com *primers* específicos para *Trypanosoma cruzi* (TCZ). Os gráficos mostram os valores de Ct (eixo y) e número de parasitas equivalentes 5 ng DNA tecidual (eixo x) expressa em Log. As concentrações usadas para construção das curvas foram: 0,05 – 0,5 – 5 – 50 ng, sendo que cada concentração equivale a números de parasitas dados para cada tecido.**

**Tabela 3** - Valores de inclinação da curva, Y na origem e  $R^2$  obtidos com a construção da curva-padrão utilizando *primers* específicos para Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  murino (TNF- $\alpha$ ).

ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR	TECIDO					
	CORAÇÃO	INTESTINO	BAÇO	MÚSCULO	PULMÃO	BEXIGA
Melhores valores de Ajuste						
Inclinação da reta de regressão	-3,215 ± 0,05775	-3,497 ± 0,09079	-3,312 ± 0,1898	-3,355 ± 0,1073	-3,160 ± 0,1790	-3,475 ± 0,09579
Y na origem	34,69 ± 0,1389	33,29 ± 0,1516	35,10 ± 0,3973	35,82 ± 0,2581	34,63 ± 0,3717	37,11 ± 0,2475
X na origem	10,79	9,521	10,6	10,68	10,96	10,68
1/inclinação da reta de regressão	-0,311	-0,286	-0,3019	-0,2981	-0,3165	-0,2878
95% intervalos de confiança						
Inclinação da reta de regressão	-3,463 a -2,967	-3,888 a -3,106	-4,129 a -2,495	-3,817 a -2,893	-3,930 a -2,390	-3,887 a -3,063
Y na origem, quando X=0,0	34,09 a 35,29	32,64 a 33,95	33,39 a 36,81	34,71 a 36,93	33,03 a 36,23	36,04 a 38,17
X na origem, quando X=0,0	10,16 a 11,52	8,680 a 10,57	8,834 a 13,50	9,634 a 12,05	9,138 a 13,94	9,785 a 11,81
<i>Grau de ajuste</i>						
$r^2$	0,9994	0,9987	0,9935	0,998	0,9936	0,9985



**Figura 14. Curvas de regressão linear construídas a partir de diluições seriadas à razão 1:10 de DNAg de tecidos, com *primers* específicos para Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).** Os gráficos mostram os valores de *Ct* (eixo y) e número de parasitas equivalentes 5 ng DNA tecidual (eixo x) expressa em *Log*. As concentrações usadas para construção das curvas foram: 0,05 – 0,5 – 5 – 50 ng, sendo que cada concentração equivale a números de parasitas dados para cada tecido.

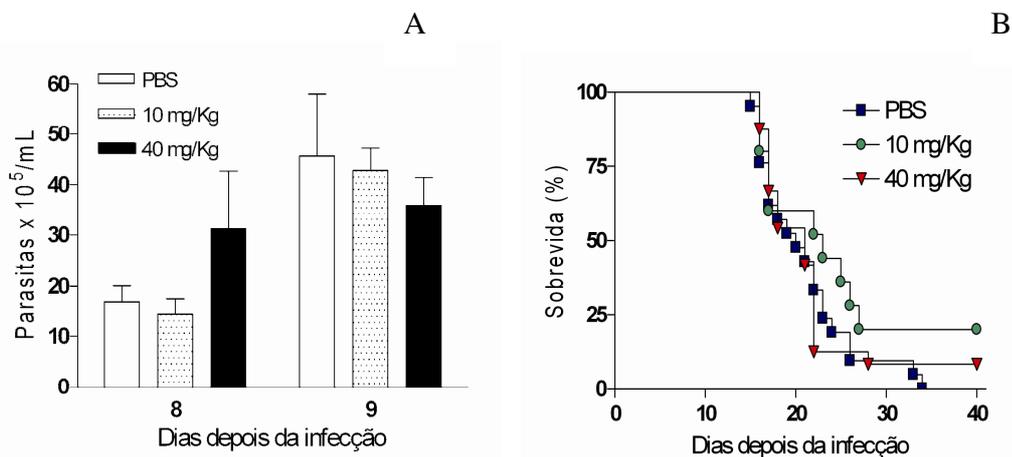


**Figura 15. Mensuração da carga parasitária no dia 15 d.p.i em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose única de T4C, através da técnica PCRq.** A-F: Os grupos foram tratados com 30 ou 100 mg/Kg, ou apenas PBS. Os gráficos mostram o número de parasitas equivalentes a 5 ng DNA tecidual nos seis tecidos de cada grupo experimental (n=3 ou 4). \* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## 4.4 Infecção e tratamento prolongado com T4C

### 4.4.1 Parasitemia e sobrevivida

Estudos farmacocinéticos demonstraram que T4C, quando injetado por via-intravenosa, é rapidamente eliminado intacto na urina em humanos (Gosalvez, 1983). No entanto, o uso de doses elevadas a fim de aumentar a disponibilidade de droga por mais tempo no hospedeiro mamífero, poderia resultar em toxicidade, como mostrado aqui. Portanto, a fim de diminuir os danos toxicológicos causados pelo T4C, e aumentar a disponibilidade dessa droga nos camundongos, propomos uma nova abordagem: avaliar o efeito do tratamento prolongado com doses baixas sobre a infecção. Os animais infectados foram tratados por 10 dias com as doses 10 ou 40 mg/kg a cada dia (12/12 horas). A maior dose foi escolhida com base na literatura, na qual se relata o uso dessa dose em humanos para tratamentos anti-tumorais. Apesar de nossos esforços, o tratamento prolongado não teve efeito algum sobre o pico parasitêmico (Figura 16A). No entanto, quando avaliamos a sobrevivida de animais que receberam a dose diária de 10 mg/Kg, vimos uma diferença ( $p=0,0581$ ) em relação ao grupo controle (tratado apenas com PBS) (Figura 16B).

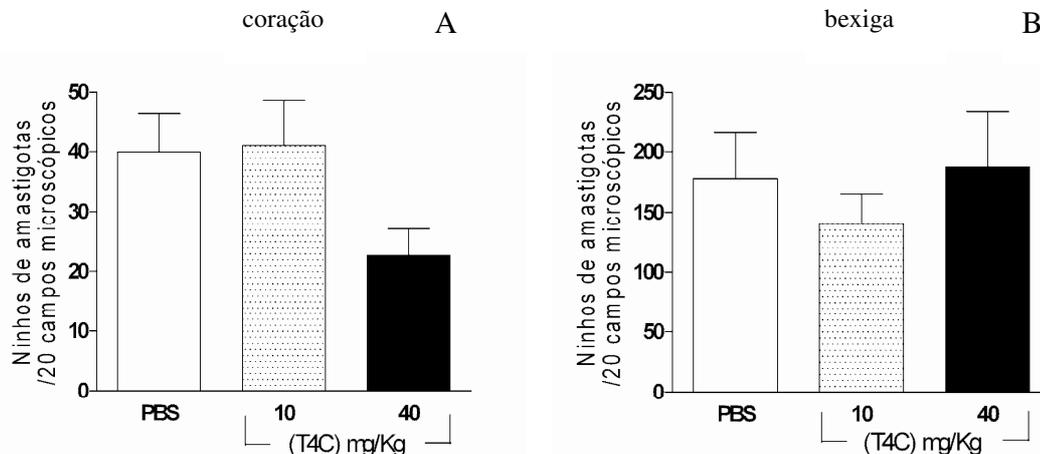


**Figura 16. Picos parasitêmicos e curva de mortalidade de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados i.p. com doses prolongadas (10 dias) de T4C. A-B: Animais infectados e tratados com 10 ou 40 mg/Kg dia, ou ainda PBS (controle) de 12/12 horas (N = 5); A: Picos parasitêmicos (8 e 9 d.p.i); B: Curva de mortalidade (N = 21).**

#### 4.4.2 Avaliação da carga parasitária em tecidos

##### (a) análise histológica

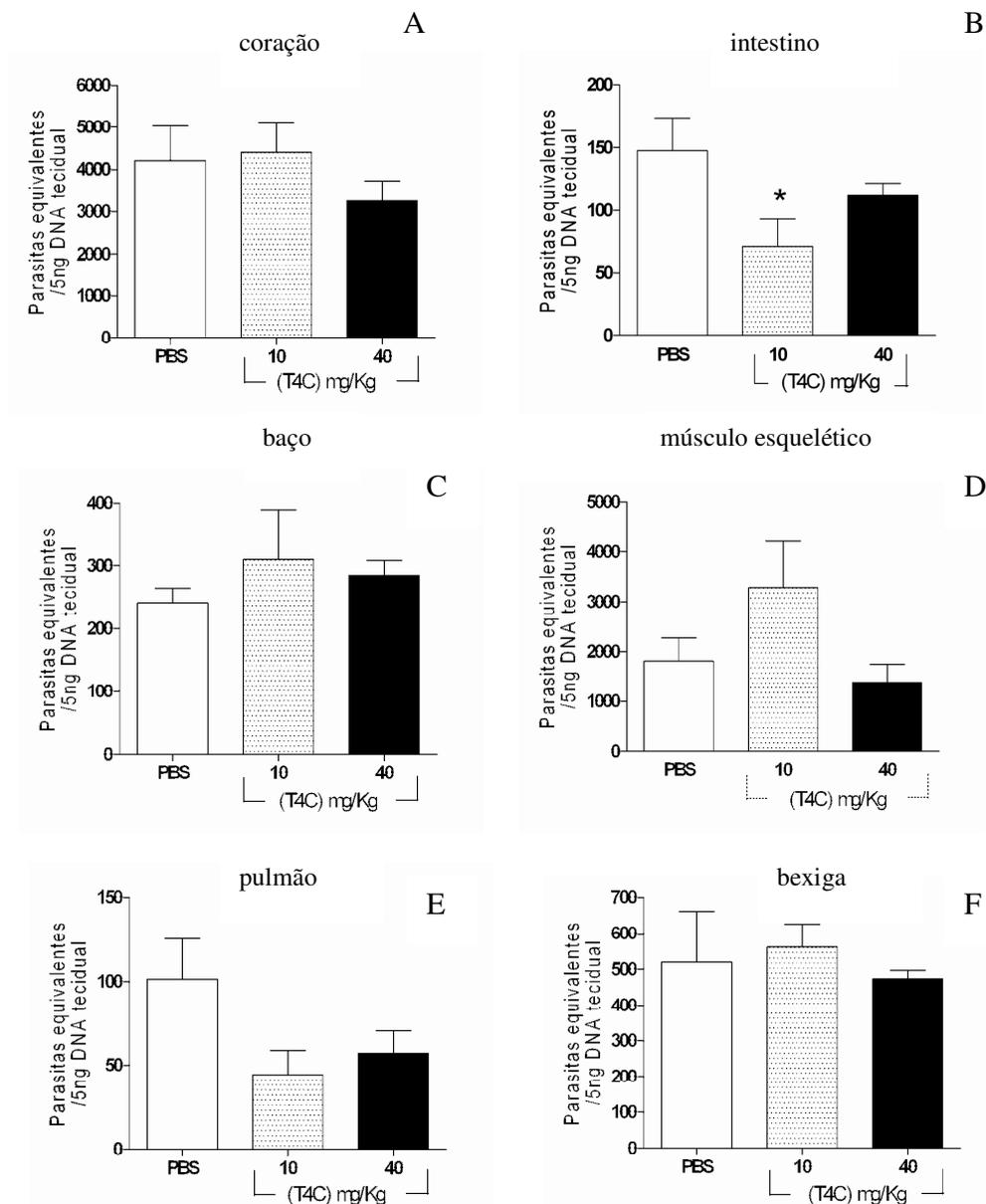
O coração de animais controles apresentou uma média de  $39,88 \pm 6,6$  ninhos de amastigotas enquanto, que nos corações de animais tratados diariamente com 10 ou 40 mg/Kg, foram encontrados  $41 \pm 7,63$  e  $22,63 \pm 4,49$  ninhos de amastigotas. A diferença entre a carga parasitária de animais controles e os tratados com a maior dose foi de 43,2%, no entanto segundo o teste estatístico esta diferença não foi significativa (Figura 17A). Já na bexiga os valores de carga parasitária foram  $178,0 \pm 39,21$  ninhos de amastigotas para animais não tratados e  $140,4 \pm 25,02$  e  $187,6 \pm 46,69$  para animais tratados, respectivamente, com as doses diárias 10 ou 40 mg/Kg (Figura 17B). Nos órgãos restantes, as médias dos grupos para distribuição da carga parasitária nos tecidos controles não ultrapassaram a marca de 1 ninho de amastigota/20 campos microscópicos, inclusive no intestino, o tecido de maior interesse devido a que foi o que mostrou um maior efeito da droga quando aplicada em dose única.



**Figura 17.** Mensuração da carga parasitária no 15 d.p.i. em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose prolongada (10 dias) de T4C. A-B: Os grupos foram tratados com 10 ou 40 mg/Kg dia, ou apenas PBS, de 12/12 horas. Os gráficos mostram os números de ninhos de amastigotas contados aleatoriamente em 20 campos microscópicos (400x), em dois tecidos de cada grupo experimental (técnica histológica H&E) (n=3 ou 4).

### **(b) PCR em tempo real**

De todos os tecidos analisados, por PCR em tempo real, somente o intestino de animais tratados diariamente com a dose mais baixa (10 mg/Kg) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (diferença de 51,7%). Nesse tecido em animais controles ou tratados com 10 ou 40 mg/Kg dia, foram encontrados  $147,5 \pm 25,85$ ,  $71,21 \pm 22,10$  e  $111,9 \pm 9,360$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA, respectivamente (Figura 18B). No coração foram detectados  $4.211 \pm 812,0$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA em animais controles, já nos tratados os valores foram  $4.402 \pm 693,5$  e  $3.246 \pm 490,3$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA, para 10 ou 40 mg/kg dia, respectivamente (Figura 18A). No baço os valores foram  $241,3 \pm 22,46$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA para animais controles, já para os tratados com 10 ou 40 mg/kg dia obteve-se  $309,9 \pm 79,78$  e  $285,0 \pm 23,10$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA, respectivamente (Figura 18C). No músculo esquelético de animais controles foram encontrados  $1.804 \pm 474,7$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA, por outro lado de animais tratados com 10 ou 40 mg/Kg dia os valores foram  $3.280 \pm 932,0$  e  $1.381 \pm 361,4$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA, respectivamente (Figura 18D). No pulmão de animais controles foram detectados  $101,6 \pm 23,98$ , e em animais tratados com 10 ou 40 mg/kg dia os valores foram  $44,47 \pm 14,33$  e  $57,17 \pm 13,66$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA, respectivamente (Figura 18E). Finalmente, na bexiga foram encontrados  $519,7 \pm 140,7$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA no grupo controle e  $560,9 \pm 64,46$  e  $473,2 \pm 24,15$  P<sub>E</sub>/5 ng de DNA nos grupos que receberam T4C nas doses 10 ou 40 mg/Kg dia, respectivamente (Figura 18D).



**Figura 18.** Mensuração da carga parasitária no dia 15 d.p.i em tecidos de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose prolongada (10 dias) de T4C, através da técnica PCR $q$ . A-F: Os grupos foram tratados com 10 ou 40 mg/Kg dia, ou apenas PBS, de 12/12 horas. Os gráficos mostram o número de parasitas equivalentes a 5 ng DNA tecidual nos seis tecidos de cada grupo experimental (n=3 ou 4). \* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.4.3 Avaliação da expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 em tecidos

Dois fatores podem estar determinando a redução da parasitemia na circulação sanguínea e carga parasitária em apenas um dos tecidos analisados (observado apenas no tratamento com dose única): (i) a ação direta do T4C sobre a viabilidade do parasita, e/ou (ii) a interação do T4C com a resposta imune, aumentando a resistência do hospedeiro à infecção. Para testar esta última possibilidade, nós propomos analisar um parâmetro da resposta imune na infecção aguda em camundongos tratados com T4C: a expressão de citocinas que poderiam determinar num hospedeiro mamífero uma parasitemia baixa ou elevada. Na infecção aguda, está descrito que IFN- $\gamma$  participa de muitos mecanismos imunológicos, sendo um deles, a ativação de macrófagos peritoneais e como consequência disso, a destruição do parasita (Reed et al., 1987). Por outro lado, a IL-10 possui efeito anti-inflamatório, e na ausência desta citocina, como mostrada em animais nocautes, ocorre redução da parasitemia, mostrando seu papel imunossupressor (Hunter et al., 1997).

De acordo com os resultados mostrados aqui, T4C (em doses elevadas) também pode ser tóxico para o hospedeiro invertebrado, causando a morte de 20 % dos camundongos (dose única) e 40 % dos camundongos (dose prolongada) não infectados. A ausência ou redução da IL-10 promoveria a redução da parasitemia, entretanto poderia acelerar a mortalidade devido ao agravamento da patologia causada por citocinas pró-inflamatórias, como exemplo, TNF- $\alpha$  (Holscher et al., 2000).

Para elucidar essas questões, a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em tecidos foi avaliada por meio da técnica PCR quantitativa - via Transcriptase Reversa (*RT-PCRq*). Para análise dos dados foi escolhido o método de  $\Delta\Delta Ct$  comparativo, no qual se obtém a razão de expressão gênica entre o gene alvo de tecidos de animais tratados e não tratados. A seqüência do gene codificante para  $\beta$ -actina foi usado como normalizador para os ensaios de expressão gênica.

##### (a) *Teste de eficiência dos primers*

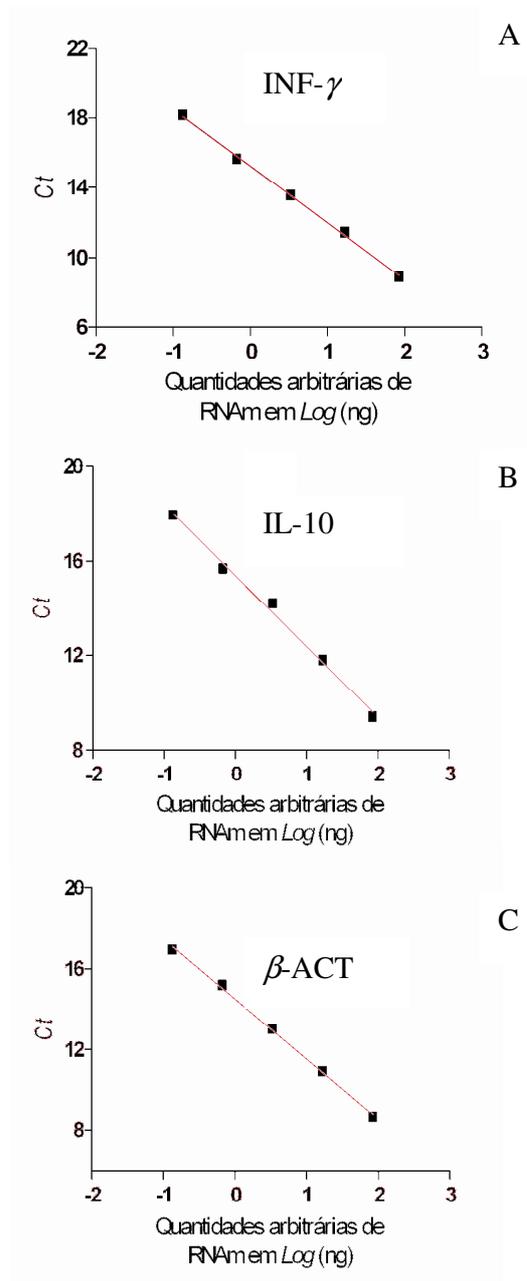
Para o teste de eficiência dos *primers*, foram feitas curvas-padrão (Figura 19) com os três pares de *primers* diferentes (IFN- $\gamma$ , IL-10 e  $\beta$ -ACT). Para isso, foram feitas clonagens dos genes de cada citocina, a fim de obter padrões quantitativos para cada gene de interesse. A corrida de *PCRq* usando o par de *primers* IFN- $\gamma$  gerou uma curva-padrão com um valor de inclinação

-3,244 ± 0,073 e um R<sup>2</sup> de 0,9985. O par de *primers* IL-10 gerou uma curva-padrão com um valor de inclinação -3,0 ± 0,136 e R<sup>2</sup> de 0,9938 e o par de *primers* β-ACT gerou uma curva-padrão com um valor de inclinação - 2,979 ± 0,0743 e R<sup>2</sup> de 0,9981, como mostrado na tabela abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4** - Valores de inclinação da curva, Y na origem e R<sup>2</sup> obtidos com a construção da curva-padrão utilizando *primers* específicos para IFN-γ, IL-10 e β-actina murinos.

ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR	PRIMERS		
	IFN-γ	IL-10	β-ACT
Melhores valores de Ajuste			
Inclinação da reta de regressão	-3,244 ± 0,07288	-3,000 ± 0,1363	-2,979 ± 0,07426
Y na origem	15,24 ± 0,08183	15,39 ± 0,1530	14,51 ± 0,08339
X na origem	4,698	5,129	4,872
1/inclinação da reta de regressão	-0,3082	-0,3333	-0,3357
95% intervalos de confiança			
Inclinação da reta de regressão	-3,476 to -3,012	-3,434 to -2,566	-3,215 to -2,742
Y na origem, quando X=0,0	14,98 to 15,50	14,90 to 15,87	14,25 to 14,78
X na origem, quando X=0,0	4,412 to 5,027	4,533 to 5,921	4,544 to 5,255
Grau de ajuste			
r <sup>2</sup>	0,9985	0,9938	0,9981

A inclinação da curva de IL-10 corresponde à inclinação da curva β-ACT dentro do desvio padrão ± 0,1, tornando o teste de eficiência validado. Embora a inclinação da curva de IFN-γ e β-ACT não sejam idênticas dentro do desvio padrão ± 0,1, a eficiência de amplificação de ambos os *primers* são estatisticamente iguais, pois as inclinações de suas curvas apresentam desvios relativamente grandes, do qual se sobrepõem. Por esse motivo, o teste de eficiência para IFN-γ também torna-se validado.

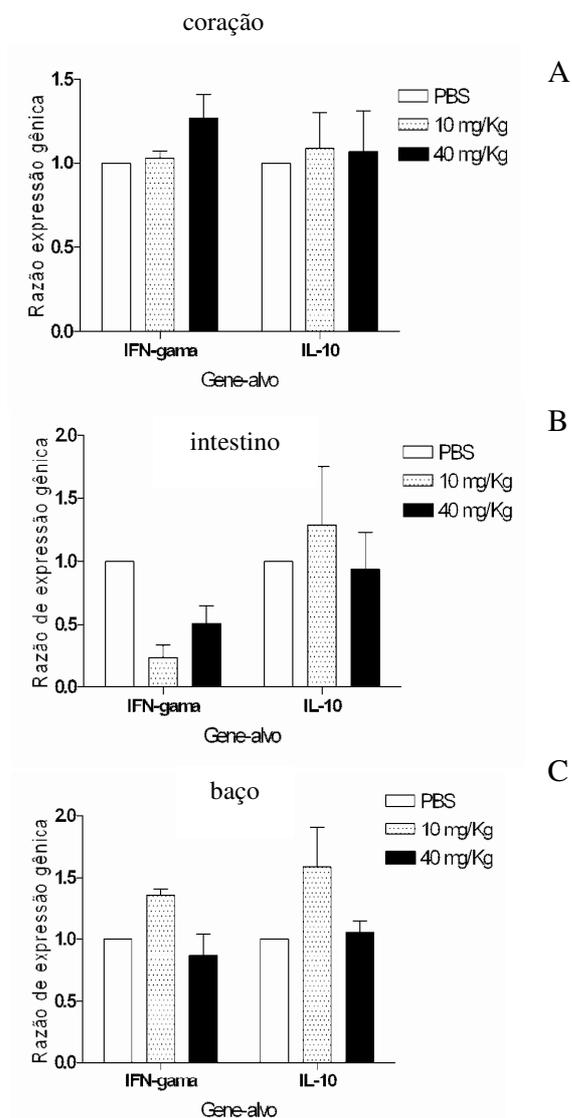


**Figura 19.** Curvas de regressão linear construídas a partir de quantidades arbitrarias de RNAm tecidual diluídas seriadamente à razão 1:5, com *primers* específicos para citocinas murinas. Os gráficos mostram os valores de Ct (eixo y) e quantidades arbitrarias de RNAm (eixo x) expressa em Log de INF- $\gamma$ , IL-10 e  $\beta$ -ACT.

### **(b) PCR quantitativa via Transcriptase Reversa (RT-PCRq)**

Para análise dos dados foi escolhido o método de  $\Delta\Delta Ct$  comparativo, no qual se obtém a razão de expressão gênica entre o gene alvo de tecidos de animais tratados e não tratados. Para efeito de análise, consideramos significativa uma diferença na expressão de RNAm quando os valores arbitrários obtidos nos animais foram pelo menos 2 vezes maiores ou menores que os valores de referência obtidos nos tecidos dos animais controle. Os corações de animais que receberam 10 ou 40 mg/kg diariamente não apresentaram diferenças na expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  ou de IL-10 quando comparados aos órgãos de animais controles (camundongos infectados e não tratados com T4C). As razões de expressão gênica de IFN- $\gamma$  em animais tratados com T4C com relação aos animais controles foram:  $1,032 \pm 0,04120$  (10 mg/Kg dia) e  $1,268 \pm 0,1457$  (40mg/kg dia). Já as razões de expressão gênica de IL-10 em animais tratados foram  $1,088 \pm 0,2111$  (10 mg/Kg dia) e  $1,068 \pm 0,2436$  (40 mg/Kg dia) (Figura 20A). No intestino, também não vimos diferenças significativas na expressão gênica das duas citocinas entre tratados e não tratados. Os valores arbitrários encontrados em animais tratados para IFN- $\gamma$  foram  $0,2330 \pm 0,09547$  (10 mg/Kg dia) e  $0,5094 \pm 0,1369$  (40 mg/Kg dia) enquanto que para IL-10, foram  $1,283 \pm 0,4669$  (10 mg/Kg dia) e  $0,9387 \pm 0,2895$  (40 mg/Kg dia) (Figura 20B). Da mesma maneira, T4C também não afetou a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 no baço de animais tratados com T4C. As razões de expressão gênica de IFN- $\gamma$  em animais tratados com relação aos animais controles foram:  $1,351 \pm 0,05979$  (10 mg/Kg dia) e  $0,8688 \pm 0,1714$  (40mg/kg dia). Já as razões de expressão gênica de IL-10 em animais tratados foram  $1,584 \pm 0,3216$  (10 mg/Kg dia) e  $1,055 \pm 0,09057$  (40 mg/Kg dia) (Figura 20C).

Como mostrado, T4C não afetou a expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 no coração, intestino ou baço, pelo menos no dia em que os tecidos foram analisados (10 d.p.i). Em virtude disso, a nossa hipótese inicial se fortalece, ou seja, T4C pode estar agindo de forma direta, afetando a viabilidade do parasita. Ainda não podemos descartar, que T4C estaria agindo sobre o sistema imune, pois existem muitos outros mecanismos imunológicos que não avaliamos aqui. Podemos concluir também, que a toxicidade observada de T4C não se deve a uma diminuição da expressão da IL-10, o que levaria a um agravamento da patologia, nesses tecidos analisados.



**Figura 20.** Variação (aumento ou diminuição) da expressão de RNAm de citocinas em tecidos no dia 10 d.p.i de camundongos Balb/C infectados i.p. com 500 formas de tripomastigotas sanguícolas e tratados com dose prolongada (10 dias) de T4C. A-C: Os grupos foram tratados com 10 ou 40 mg/Kg dia, ou apenas PBS, de 12/12 horas. Os gráficos mostram a razão de expressão gênica de IFN- $\gamma$  e IL-10 em três tecidos de cada grupo experimental (n=3 ou 4) (RT-PCRq).

Em síntese, nossos resultados mostraram uma redução significativa na carga parasitária apenas no intestino, da qual correlaciona positivamente com a diminuição de parasitas circulantes de animais tratados com 100 mg/Kg. No entanto, não pudemos observar uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a sobrevivência de animais tratados e controle. T4C não mostrou nenhum efeito sobre a expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 no coração, intestino ou baço. Portanto, T4C poderia estar agindo diretamente sobre a viabilidade do parasita.

## 5 DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo de vida que alterna em diferentes ambientes (o trato intestinal do inseto, o sangue do hospedeiro vertebrado e o citoplasma da célula do hospedeiro mamífero). A disponibilidade de metabólitos presentes nestes espaços é fundamental para a sua sobrevivência. Embora a glicose seja metabolizada preferencialmente por tripomastigotas de *T. cruzi* presentes no sangue do hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas que residem no citoplasma da célula do hospedeiro mamífero apresentam baixa ou nula atividade de transporte de glicose, sugerindo que sua principal fonte de energia são os aminoácidos, dentre eles a prolina. Esse aminoácido pode ser fornecido por biossíntese ou hidrólise de proteínas endógenas, ou até mesmo fornecida exogenamente pelo próprio hospedeiro vertebrado (no caso de epimastigotas intracelulares) (Silber et al., 2009).

O Ácido *L*-tiazolidina-4-carboxílico (T4C), um análogo estrutural da prolina, mostrou atividade de inibição competitiva sobre o transporte desse aminoácido, diminuindo o estoque de prolina intracelular quando incubado na presença de prolina e T4C. Esse composto mostrou também atividade tripanocida em epimastigotas. Além disso, interagiu sinergicamente com condições de estresse que o parasita sofre naturalmente ao longo do seu ciclo de vida. Quando testado em células de mamífero infectadas pelo *T. cruzi*, T4C reduziu a liberação de tripomastigotas no meio de cultura ( $p < 0,05$ ) (Magdaleno et al., 2009). A partir desses dados relatados na literatura, levantamos a hipótese que T4C poderia apresentar um melhor efeito quando testado *in vivo*, pois estaria agindo sinergicamente com as diferentes condições de estresse presentes dentro do hospedeiro mamífero, tais como, mudanças de temperatura, estresse oxidativo, e mais ainda neste caso, estresse metabólico.

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* possui picos parasitêmicos precoces, sendo altamente virulenta e patogênica, e produzindo uma alta mortalidade e lesões tissulares graves (Scorza e Scorza, 1972). Portanto, junto à linhagem de camundongo Balb/c, o modelo experimental escolhido torna-se ideal para o estudo de infecção chagásica aguda. A escolha do tamanho do inóculo é crucial, pois determina qual dia será o pico parasitêmico e o momento da mortalidade. Além disso, o número de parasitas inoculados pode determinar a eficácia de uma droga em estudo. Para isso, foi feito um ensaio de infecção em camundongos com diferentes tamanhos de inóculos, a fim de determinar quantas DL<sub>50</sub> seriam inoculadas. Os animais que receberam 500

ou 750 formas de tripomastigotas sanguícolas tiveram o pico da parasitemia no 9º d.p.i., enquanto que, os animais infectados com 1000 formas apresentaram o pico da parasitemia no 8º d.p.i.(Figura 6). Nenhuma das doses testadas matou 100 % dos camundongos. Os animais que receberam 500, 750 ou 1000 formas tiveram 70, 80 e 90 %, respectivamente, de mortalidade (Figura 7). Então, neste trabalho utilizaram-se 500 formas de tripomastigotas sanguícolas da cepa Y, equivalente a 1,7 DL<sub>50</sub>.

### **5.1 Efeito de T4C (dose única) sobre a infecção *in vivo*, pelo *T. cruzi***

Uma vez que, os três tamanhos de inóculo mostraram ser subletais, pode ser dito que são aptos para ensaios de infecção, no qual se avalie o efeito de drogas anti-*T. cruzi*. Portanto, para avaliar o efeito de T4C sobre a infecção pelo *Trypanosma cruzi*, com este modelo experimental escolhido, foram utilizadas em nossos experimentos 1,7 DL<sub>50</sub>. O tratamento de camundongos com dose única de T4C (100 mg/Kg) diminuiu 48,8% o pico parasitêmico (8 d.p.i.) em relação ao controle (grupo que recebeu apenas o veículo da droga: PBS) (p<0.01) (Figura 9B). Embora os animais tratados com 150 mg/Kg apresentassem uma redução de 40,7 % do pico parasitêmico, não vimos diferenças estatisticamente significantes (ANOVA de uma via e post-test de Tukey) quando comparados ao controle (Figura 9A). Da mesma forma, os animais tratados com outras doses: 30, 50 ou 200 mg/Kg não apresentaram redução estatisticamente significativa em suas parasitemias em relação ao controle. Quando avaliamos a sobrevivência de animais infectados e tratados com doses baixas (dose única de 30 ou 50 mg/Kg ou dose prolongada de 10 mg/kg dia) em pelo menos quatro experimentos independentes, vimos sutis atrasos na mortalidade em relação aos grupos controle respectivos (Figuras 10B, 10C e 16B), porém, sem diferenças estatísticas (Logrank-test). Todavia, quando aplicamos o mesmo teste estatístico para avaliar as diferenças entre a mortalidade de animais tratados com 30 e os tratados com 150 mg/Kg, observamos uma diferença estatisticamente significativa (p<0,05) (Figura 10B). É provável, que a diferença na mortalidade observada entre grupos tratados (30 e 150 mg/Kg) se deve ao fato que uma branda toxicidade começa a surgir em camundongos tratados com a dose de 150 mg/Kg.

Como mencionado anteriormente, quando o parasita é tratado com T4C, fica mais sensível a diferentes condições de estresse reduzindo a liberação de tripomastigotas das células de

mamífero infectadas (Magdaleno et al., 2009). Quando administrado *in vivo*, o T4C poderia estar agindo sinergicamente com diferentes condições de estresse produzidas pelo próprio hospedeiro mamífero, e então diminuindo com mais eficiência a quantidade de parasitas circulantes no sangue (somente na dose de 100 mg/Kg). Não podemos afirmar que esse evento seja o único responsável pela redução da parasitemia. Por isso, buscamos na literatura informações a respeito dos efeitos de T4C sobre outros sistemas, dentre eles o imunológico. Trabalhos prévios avaliando T4C sobre a resposta imune em camundongos senescentes mostraram que esse composto melhora a capacidade proliferativa de linfócitos ativados com Concanavalina A. Foi mostrado também a importância de T4C no aumento da atividade de linfócitos *Natural Killers* (NK) em camundongos jovens e senescentes (De La Fuente et al., 1998; Ferrandez et al., 1999). Além disso, animais tratados com T4C mostraram uma diminuição nos níveis de corticosterona (hormônio imunossupressor que diminui a resposta inflamatória) no soro (De La Fuente et al., 1998; Ferrandez et al., 1999) que eventualmente, poderia levar a uma resposta pro-inflamatória exacerbada, no caso de um estímulo devido à infecção. Dessa forma, propomos uma explicação alternativa: o T4C (na dose de 100 mg/Kg) poderia estar agindo direta ou indiretamente sobre o sistema imune, e levando os animais a controlarem a parasitemia.

Como já foi dito, o teste estatístico não mostrou diferença significativa entre a mortalidade dos grupos testes e controle. Porém, não podemos descartar que esse atraso sutil observado na mortalidade nos grupos tratados com doses baixas, possa acontecer devido ao efeito protetor da droga que também apresenta ação antioxidante. E como já mencionado, foram observadas diferenças estatísticas entre a mortalidade de animais tratados com 30 e 150 mg/Kg ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B). A hormese pode explicar esses dados. Classicamente, a hormese refere-se ao fenômeno do qual, as respostas de um organismo a agentes químicos ou físicos são qualitativamente diferentes quando este agente está presente em alta ou baixa intensidade. Um exemplo, seria um agente químico potencialmente tóxico, que pode exibir efeitos favoráveis quando estão presentes em baixas concentrações (Masoro, 2007). Em um estudo, foi demonstrado que o ácido tânico, um polifenol de planta com atividades antioxidantes, anticarcinogênico e antimutagênico, prolonga a sobrevivência de *Caenorhabditis elegans* e, além disso, melhora a resistência ao estresse por temperatura e aumenta, sutilmente, a resistência ao estresse oxidativo. Todos esses efeitos foram bem maiores quando foram utilizadas apenas doses

baixas. Os autores sugerem a presença do efeito hormese por parte da droga (Saul et al., 2010). Kitani et al. (2006) também mostraram, experimentalmente, o efeito hormético de um droga (Deprenil) sobre a sobrevivência de ratos senescentes da linhagem F344/DuCrj. Nesse trabalho, os resultados indicam claramente que uma dose adequada dessa droga, dentro de um intervalo de doses, pode significativamente aumentar a sobrevivência dos ratos. No entanto, em doses que superem esse determinado intervalo, a droga apresenta menores efeitos, podendo também exibir um efeito inverso sobre a sobrevivência desses animais (Kitani et al., 2006).

Os nossos resultados mostram que T4C, em doses baixas, parece favorecer a sobrevivência sem nenhuma interferência com a parasitemia. Por outro lado, em doses altas diminuí a sobrevivência dos camundongos. E então, somente na dose de 100 mg/kg, T4C é capaz de reduzir significativamente a parasitemia. Sugerimos, com base na literatura, que T4C poderia estar exibindo um efeito hormético sobre a sobrevivência de camundongos. Pode ser que, se diminuirmos ainda mais a dose única de T4C (menor que 30 mg/Kg) poderíamos ver uma diferença estatística na sobrevivência em relação ao controle. Entretanto, de acordo com Gosálvez (1980), T4C é rapidamente eliminado na urina, o que levaria a diminuir a sua biodisponibilidade nos camundongos, já que esta administração está sendo efetuada em dose única. Então, outra abordagem foi avaliar o efeito do tratamento prolongado de T4C, em doses baixas, sobre a infecção pelo *T. cruzi*.

## **5.2 Efeito do tratamento prolongado de T4C sobre a infecção *in vivo*, pelo *T. cruzi*.**

Se a hipótese do efeito hormético for confirmada, não seria adequado o uso de doses elevadas. Portanto, como nova abordagem, foi avaliado o efeito do tratamento prolongado, em doses baixas, sobre a infecção. Na literatura foi proposto por Gosálvez (1980), que a administração de T4C em pacientes com câncer, deve respeitar a dose diária de 40 mg/Kg (6/6 horas). Como base nessa sugestão, os camundongos infectados aqui foram tratados com duas doses: 10 ou 40 mg/kg dia, de 12 em 12 horas, durante 10 dias. Apesar de nossos esforços, o tratamento prolongado não teve efeito algum sobre o pico parasitêmico (Figura 16A). No entanto, quando avaliamos a sobrevivência de animais que receberam a dose diária de 10 mg/Kg, vimos uma diferença estatística que consideramos significativa, ( $p=0,0581$ ) em relação ao grupo controle (tratado apenas com PBS) (Figura 16B). Na literatura está descrito que a

suplementação prolongada de T4C (2 mg por Kg de comida) aumenta a sobrevivência de camundongos que apresentam fenótipo de senescência acelerada ( $p < 0,01$ ). A diferença observada nesse estudo foi de até 29% em relação ao grupo controle (não suplementados) (Navarro et al., 2007). Em outros estudos, T4C também aumentou a sobrevivência em 53,1 % da população de *Drosophila melanogaster* tratada com esse composto (0,3 % de T4C presente no meio de cultura) (Miquel et al., 1982).

Na literatura foram descritas uma variedade de funções para T4C, como agente oxidante intracelular e quelante de radicais livres (Weber et al., 1982). Está descrito que o T4C previne a carcinogênese no estômago de ratos induzida pelo refluxo duodenal, devido a sua ação quelante de espécies nitrosas (Suo et al., 2006). Além disso, T4C, *in vitro*, melhora a atividade de enzimas anti-oxidantes (De La Fuente e Miquel, 2009) e *in vivo*, melhora diversas funções de células imunes, como por exemplo a função de macrófagos peritoniais de camundongos com fenótipo de senescência acelerada (Correa et al., 1999). No trabalho de Navarro et al. (2007), o aumento da sobrevivência de camundongos senescentes tratados com T4C, foi associado com uma melhora nas funções neurológicas. Foram observados até 70% de redução no dano oxidativo no cérebro e fígado associado à idade e a prevenção de até 74% da redução das atividades de enzimas mitocondriais, NADH-desidrogenase, citocromo *c* oxidase, e óxido nítrico sintase mitocondrial. T4C também demonstrou efeito sobre o sistema imune de camundongos senescentes. A droga estimulou a resposta linfoproliferativa à Concanavalina A, a mobilidade dos linfócitos, quimotaxia, bem como, a atividade de leucócitos como exemplo, as células NK (De La Fuente et al., 1998). Além disso, os níveis de corticosterona, um hormônio imunossupressor, foram reduzidos no soro desses animais. O aumento da atividade de linfócitos NK também foi observado por Ferrandez et al. (1999) em camundongos jovens e senescentes suplementados com T4C.

Não há nenhuma evidência nesses trabalhos, que T4C apresente algum efeito hormético sobre os modelos animais. As únicas evidências encontradas que reforçam a hipótese de um possível efeito hormético, foram relatadas numa revisão feita por Gosalvez (1983), na qual descrevem-se os efeitos de T4C sobre células tumorais humanas. De acordo com o autor, a droga mostrou efeito anti-tumoral apenas em baixas concentrações, sendo capaz de retardar eficientemente o crescimento dessas células, alterar a morfologia celular e a síntese protéica. Quando analisadas, as células tumorais continham menores volumes de DNA e RNA e baixo

transporte de prolina e Na<sup>+</sup> (Gosalvez, 1983). Um trabalho prévio (Knowles e Ballard, 1978) também demonstrou o efeito inibitório sobre a síntese de proteínas em reticulócitos.

Mais estudos com o análogo de prolina, o T4C, seriam necessários para confirmar a hipótese do efeito hormético sobre os camundongos infectados pelo *T. cruzi*. No entanto, a pergunta mais relevante neste contexto foi a respeito da eventual toxicidade de T4C. Como descrito acima, nos trabalhos de Gosalvez (1983) e Knowles e Ballard (1978), T4C interfere com a síntese protéica em células de mamífero, bem como outros processos relevantes. Por isso, nós nos propomos avaliar os indicadores de toxicidade da droga em estudo.

### **5.3 Avaliação dos indicadores de efeitos tóxicos de T4C**

O estudo da toxicidade de drogas sobre sistemas biológicos é essencial antes de se iniciar um estudo aprofundado no qual se avalie seus efeitos curativos. Embora existam muitas revisões na literatura que apresentam abordagens terapêuticas promissoras anti *T. cruzi*, (Duschak e Couto, 2007; Boscardin et al., 2010), a validação das mesmas em termos de toxicidade para o hospedeiro mamífero tornam-se cada dia mais exigentes. Por esse motivo, e para uma interpretação mais adequada dos resultados, fez-se a avaliação de indicadores de toxicidade de T4C sobre camundongos não infectados. Para isso, esses animais receberam T4C em doses únicas de 50 ou de 200 mg/Kg ou apenas PBS (controle). Os parâmetros analisados foram a evolução do peso corporal e sobrevida, parâmetros que foram registrados durante 40 dias. No 12<sup>o</sup> dia após a injeção de T4C, o grupo controle e os tratados com doses de 50 ou 200 mg/Kg apresentaram um aumento de 7,9%, 5,6% e 1,4% de peso corporal, respectivamente, em relação ao seu peso inicial. Além disso, T4C na dose de 200 mg/Kg levou à morte a 20% dos camundongos, um dia após a sua administração. Quando administrado por período prolongado (10 dias) T4C reduziu progressivamente o peso de animais tratados com a maior dose (200 mg/Kg) e diminuiu 40% a sobrevida em relação ao grupo controle (Figura 8).

Um trabalho usando camundongos Swiss CD-1/UCadiz, que apresentam senescência acelerada (Navarro et al., 2007), mostrou que a dieta com T4C induz a redução espontânea de ingestão de alimento e a redução do dano oxidativo mitocondrial associado à idade. Também foi observado o aumento da sobrevida nesses camundongos, provavelmente ligado ao efeito de restrição calórica (Mccay et al., 1989; Koubova e Guarente, 2003; Canto e Auwerx, 2009).

Segundo Navarro et al. (2007), a diminuição da ingestão de alimentos está associada a uma possível regulação que envolve os centros de apetites hipotalâmicos.

A restrição calórica aumenta a sobrevivência de ratos, camundongos e diversas outras espécies e também modula a deterioração fisiológica associada à idade, atrasando a progressão de doenças (Weindruch et al., 1988). Muitos estudos têm sido realizados avaliando o efeito da restrição calórica sobre camundongos senescentes. Maeda et al. (1985), mostraram que 68% dos ratos (machos linhagem F344) submetidos à alimentação *ad libitum*, tinham nefropatia severa e 19% apresentavam cardiomiopatia no seu tempo espontâneo de morte, comparados com 1% e 6% respectivamente, dos ratos submetidos à restrição calórica (Maeda et al., 1985). A restrição calórica também foi associada ao retardamento do aparecimento da leucemia/linfoma (a principal doença neoplásica nesta linhagem de ratos), no entanto, não houve diminuição da progressão do câncer (Shimokawa et al., 1993). Vale a pena ressaltar que o resultado da restrição calórica pode mascarar qualquer aumento na mortalidade que poderia ser causada pela exposição à substância tóxica (Neafsey, 2008). Por isso, um estudo mais aprofundado a fim de caracterizar os efeitos separados de hormese, restrição calórica e toxicidade seriam necessários antes de aprovarmos qualquer hipótese.

#### **5.4 Danos teciduais mediados por drogas**

Todos os compostos são tóxicos em doses elevadas e podem ser seguros e eficazes quando administrados em doses baixas. Os problemas mais comumente encontrados estão relacionados à toxicidade cardiovascular e hepática. Muito progresso vem sendo realizado nos recentes anos, em entender os mecanismos de toxicidade causados pelos metabólitos de drogas. A partir de uma perspectiva anatômica e funcional, o fígado desempenha um papel crítico dentro da disposição de agentes terapêuticos administrados por via oral, servindo como um portal de entrada para os tecidos, e representa um maior sítio de metabolismo de drogas. Produtos de metabolismo de drogas vêm sendo implicados como agentes causadores de diversos tipos de toxicidade e não é surpreendente, que o fígado represente o maior sítio de toxicidade induzida por droga (Lee, 2003; Kaplowitz, 2005; Stevens e Baker, 2009). Muitas drogas que são comercializadas apresentam avisos de risco de toxicidade hepática, ou restrições severas em seus usos. Vale ressaltar que, para a maioria das drogas hepatotóxicas, a bioativação a

metabólitos quimicamente reativos está demonstrada *in vitro* (exemplo: tecido hepático humano) ou *in vivo* (por meio da caracterização de metabólitos estáveis, produtos de outras enzimas na mesma via metabólica). É surpreendente que drogas administradas em pacientes em doses diárias de 100 mg ou mais, tendem a ser as que mais causam dano hepático, enquanto que as drogas administradas em baixas doses (10 mg por dia ou menos) raramente causam problema com esse respeito (Utrecht, 2003; Smith e Schmid, 2006).

T4C possui também um potencial de detoxificação de nitrito. Devido a essa propriedade, o T4C já foi usado em humanos na detoxificação de espécies nitrosas carcinogênicas (Tsuda et al., 1983; Tsuda et al., 1984; Tsuda e Kurashima, 1991; Tsuda et al., 1995; Suo et al., 2006). No entanto, foi demonstrado que quando o T4C é administrado por via oral em humanos, acarreta maiores efeitos tóxicos, do que por via intravenosa, devido a que, ao chegar ao estômago, T4C é hidrolisado em formaldeído e cisteína, sendo o formaldeído o causador da toxicidade (Gosalvez, 1983). Já, segundo Tsuda e Kurashima (1991), quando administrado por via oral T4C não é metabolizado, mas excretado como *N*-nitrosotioprolina na urina.

Em síntese, nossos dados mostram que o T4C induz a perda de peso corporal e chega a ser tóxico na dose de 200 mg/Kg provocando a morte de 20% dos camundongos quando administrado em dose única ou 40 % dos camundongos quando administrado de forma prolongada.

## **5.5 Avaliação da carga parasitária em tecidos**

Diferenças na distribuição de *T. cruzi* em tecidos podem desempenhar um papel importante na patogenia da doença de Chagas. Trabalhos clássicos demonstram a existência de cepas de *Trypanosoma cruzi* com diferentes tropismos para diferentes tecidos (Vianna, 1911; Campos, 1927; Taliaferro e Pizzi, 1955; Bice e Zeledon, 1970; Andrade e Macedo, 1973; Hanson e Roberson, 1974). A maioria dos autores detectou o acúmulo de parasitas em tecidos examinados em períodos definidos do curso da infecção chagásica. Somente em 1978, Melo e Brener realizaram um estudo sistemático da distribuição de parasitas intracelulares em tecidos, nos quais grupos de camundongos foram inoculados com quatro cepas diferentes. Os autores encontraram entre os dias 7 e 8 p.i. uma carga parasitária extremamente alta no baço, fígado e medula óssea em animais inoculados com a cepa Y. Outros tecidos como, bexiga, pulmão,

coração, músculo esquelético, intestino e dentre outros que foram analisados antes do dia 11 p.i., apresentaram carga parasitária relativamente baixa. Os autores sugerem que o coportamento “fagotrópico” dessa cepa, pode explicar a preferência por esses tecidos (Melo e Brener, 1978).

Neste trabalho, nós avaliamos o efeito de T4C sobre a carga parasitária dos seguintes tecidos: coração, pulmão, baço, intestino, bexiga e músculo esquelético, no 15 d.p.i. Para isso, foi estimado, aleatoriamente, o número de ninhos de amastigotas presentes em 20 campos microscópicos. A distribuição encontrada nos diferentes órgãos em camundongos não tratados mostrou que a maior carga parasitária foi encontrada na bexiga, apresentando  $158,8 \pm 34,16$  ninhos de amastigotas (Figura 12F). Já o baço apresentou a menor carga parasitária (os valores variaram entre 0 e 1 ninho de amastigota por camundongo) (Figura 12C). De acordo com Melo e Brener (1978), uma carga parasitária consideravelmente alta é encontrada no baço apenas entre 7 e 8 d.p.i. Eles explicam que, a partir de 11 d.p.i., já é muito difícil encontrar parasitismo nesse tecido, devido à intensa destruição do parasita. No entanto, em órgãos como tecido muscular, a carga parasitária pode aumentar após esse dia (Melo e Brener, 1978). De todos os órgãos analisados aqui, apenas o intestino de animais tratados com T4C apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa no número de ninhos de amastigotas quando comparados ao grupo controle. A redução observada no intestino de animais tratados com dose única de T4C (150 mg/Kg) foi de 90,3% ( $p < 0.01$ ) (Figura 11 e 12B). Não vimos redução da carga parasitária na dose 30 mg/Kg. No coração, o grupo que recebeu a droga na dose 30 ou 150 mg/Kg teve uma redução 47,4% e 49,8% do número de ninhos de amastigotas, no entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas, quando comparas ao grupo controle (Figura 12A). O tratamento prolongado (10 ou 40 mg/Kg dia) não teve efeito algum sobre a carga parasitária do coração e bexiga (Figura 17). Nos órgãos restantes, as médias dos grupos para distribuição da carga parasitária nos tecidos controles não ultrapassaram a marca de 1 ninho de amastigota/20 campos microscópicos, portanto não foi possível analisá-los.

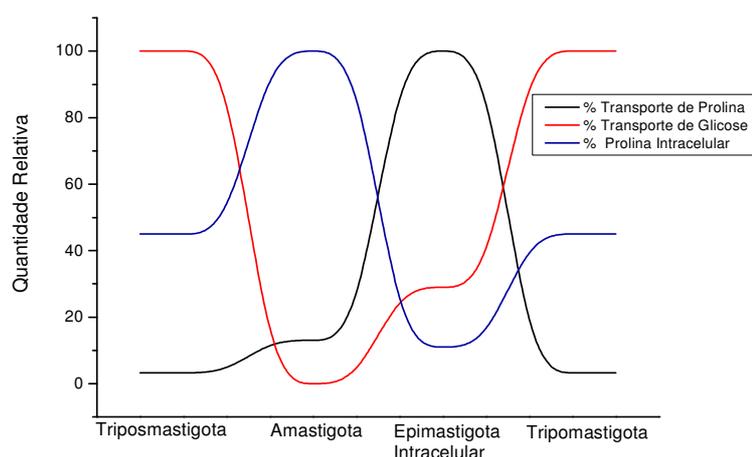
Há uma variedade de métodos que vem sendo usado para detectar *T. cruzi* em tecidos, tais como coloração de cortes de tecidos por Hematoxilina-Eosina, PCR *in situ* e PCR competitivo, no entanto, tratam-se de técnicas semi-quantitativas. Cummings e Tarleton (2003) demonstraram a habilidade de PCR em tempo real em detectar baixos níveis de parasitas distribuídos em diferentes tecidos de camundongos cronicamente infectados. Essa técnica foi

capaz de identificar variações na carga parasitária em diferentes tecidos, em animais infectados com diferentes cepas do parasita, a diferentes tempos pós-infecção e com diferentes doses de infecção. Portanto, para confirmar os dados de carga parasitária nos seis tecidos citados acima, nós adaptamos do trabalho de Cummings e Tarleton (2003) a técnica de PCR quantitativa. Não achamos na literatura o uso dessa técnica para quantificar carga parasitária em tecidos de animais que receberam algum tratamento, por esse motivo nós fomos o primeiro grupo em adaptar esta técnica e aplicá-la com esse propósito.

Como os animais tratados com T4C em dose única de 100 mg/Kg tiveram o menor pico de parasitemia dentre outras doses testadas (Figura 9B), nós decidimos prosseguir com PCR quantitativa, avaliando os órgãos de animais tratados a 30 e 100 mg/Kg de T4C. O tecido com a menor carga parasitária foi o pulmão apresentando  $9,7 \pm 2,2 P_E/5$  ng de DNA tecidual e a maior carga parasitária detectada foi no coração, com  $2.797 \pm 470 P_E/5$  ng de DNA tecidual. A análise por PCR quantitativa da carga parasitária em tecidos de animais tratados com T4C confirmou os dados acima, referentes à contagem de ninhos de amastigotas nos tecidos. Na dose de 100 mg/Kg, T4C reduziu 91,2% ( $p < 0,01$ ) a carga parasitária no intestino de animais tratados quando comparados ao grupo controle (Figura 15B). Da mesma maneira, o tratamento prolongado com T4C, reduziu a carga parasitária no intestino de animais tratados somente com a dose menor (10mg/Kg dia) ( $p < 0,05$ ) (Figura 18B), sugerindo efeito hormético. Não vimos redução significativa na carga parasitária de outros tecidos de animais tratados.

Como mencionado anteriormente, além das possíveis vias de toxicidade ou proteção contra fatores de estresse no hospedeiro mamífero, T4C interfere com o transporte de prolina em *T. cruzi* (Magdaleno et al., 2009). Já foi mostrado também, que o transporte de prolina em *T. cruzi* é fundamental no ciclo intracelular do parasita, fundamentalmente na diferenciação de epimastigotas intracelulares para tripomastigotas (Tonelli et al., 2004; Silber et al., 2009). As formas amastigotas que residem no citoplasma da célula do hospedeiro mamífero apresentam baixa ou nula atividade de transporte de glicose, sugerindo que sua principal fonte de energia são os aminoácidos, dentre eles a prolina. Esse aminoácido pode ser fornecido por biossíntese ou hidrólise de proteínas endógenas (no caso de amastigotas), ou até mesmo fornecido exogenamente pelo próprio hospedeiro vertebrado (no caso de epimastigotas intracelulares) (Silber et al., 2009). O T4C, por ser um análogo estrutural à prolina, compete com este aminoácido pelo mesmo sítio de ligação em dois transportadores presentes em *T. cruzi*,

previamente descritos (Silber et al., 2002). Esse evento leva a redução de prolina intracelular, que por sua vez interfere com viabilidade do parasita. Silber et al. (2009) mostraram que as formas epimastigotas intracelulares possuem a maior taxa de transporte de prolina, de todas formas analisadas. Estas formas possuem, no entanto, o menor estoque de prolina intracelular, necessitando de uma fonte de aminoácido externa para prosseguir com a diferenciação para tripomastigotas (Figura 21). Já, as formas amastigotas possuem a menor taxa de transporte de prolina e os maiores níveis de prolina intracelular. É provável que as formas amastigotas gastem todo o seu estoque para replicação. Com esta base, espera-se que T4C tenha efeito, principalmente, sobre o estágio de epimastigota intracelular, interferindo com a diferenciação para as formas tripomastigotas.



**Figura 21.** Variações relativas das atividades dos transportadores de glicose e prolina e concentrações de prolina intracelular livre durante o ciclo de vida do ciclo de vida do *T. cruzi*  
 FONTE: Silber et al. (2009)

## 5.6 Expressão gênica de IFN- $\gamma$ e IL-10 em tecidos

Como mencionado anteriormente, dois fatores podem estar determinando a redução da parasitemia na circulação sanguínea e carga parasitária em apenas um dos tecidos analisados: (i) a ação direta do T4C sobre a viabilidade do parasita, e/ou (ii) a interação do T4C com a resposta imune, aumentando a resistência do hospedeiro à infecção. Para testar esta última possibilidade,

nós propomos analisar um parâmetro da resposta imune na infecção aguda em camundongos tratados com T4C: a expressão de citocinas que poderiam determinar num hospedeiro mamífero uma parasitemia baixa ou elevada.

Diferentes mecanismos imunológicos podem ser desencadeados por IFN- $\gamma$ , tal como a ativação de macrófagos. Animais nocautes para a produção de IFN- $\gamma$  e seu receptor, demonstraram maiores taxas de parasitemia e mortalidade (Holscher et al., 1998). A relevância IFN- $\gamma$  na fase aguda da infecção tem sido demonstrada devido a sua capacidade de ativar macrófagos peritoneais, e por sua vez, induzir a destruição do parasita (Reed et al., 1987). O tratamento de camundongos com IFN- $\gamma$  recombinante induziu a ativação de macrófagos e conseqüentemente, interrompeu a fase aguda, a imunossupressão e a mortalidade (Reed, 1988). Enquanto que, camundongos que receberam anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  demonstraram maior parasitemia e sobrevida reduzida quando comparados aos animais que receberam o anticorpo controle (Torricco et al., 1991; Abrahamsohn e Coffman, 1996). IFN- $\gamma$  também induz a produção de NO pelo macrófagos (Nathan et al., 1979; McCabe e Mullins, 1990; Vray et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992). Existe ainda, uma quantidade de outros trabalhos demonstrando a importância de IFN- $\gamma$  no controle da fase aguda da infecção. Por outro lado, a IL-10 possui efeito anti-inflamatório. Em camundongos deficientes para a produção de IL-10, observa-se redução da parasitemia, entretanto, a mortalidade é acelerada devido ao aumento dramático da patologia aguda (Hunter et al., 1997). A ausência de IL-10 em animais infectados leva a uma dramática produção de TNF- $\alpha$  e o desenvolvimento de uma síndrome similar ao choque endotóxico, além de diminuir a sobrevida (Holscher et al., 2000).

A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 no coração, intestino e baço foi avaliada aqui, por meio da técnica PCR quantitativa - via Transcriptase Reversa (*RT-PCRq*), utilizando-se o método de  $\Delta\Delta Ct$  comparativo. Como mostrado, T4C não afetou a expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em nenhum dos tecidos avaliados, pelo menos no dia em que os tecidos foram analisados (10 d.p.i). Em virtude disso, a nossa hipótese inicial se fortalece, ou seja, T4C pode estar agindo de forma direta afetando a viabilidade do parasita. Ainda não podemos descartar que T4C estaria agindo sobre o sistema imune, pois existem muitos outros mecanismos imunológicos que não avaliamos aqui.

Em síntese, nossos resultados mostraram que o tratamento com dose única de T4C (100 mg/Kg) reduziu significativamente a carga parasitária em apenas um tecido, o intestino, que

correlaciona positivamente com a diminuição de parasitas circulantes. Entretanto, não houve qualquer correlação entre parasitemia e sobrevivência de animais tratados com qualquer uma das doses únicas. Por outro lado, o tratamento prolongado com T4C, reduziu a carga parasitária no intestino de animais tratados somente com a dose menor (10 mg/Kg dia). Observamos uma correlação positiva da carga parasitária no intestino e mortalidade de animais tratados com a dose menor. Porém, não vimos qualquer correlação entre número de parasitas circulantes e carga parasitária tecidual, já que o tratamento prolongado não interferiu com a parasitemia sanguínea. A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos três tecidos analisados (coração, intestino e baço) não foi afetada pelo tratamento com T4C. Por isso, sugerimos que T4C pode estar agindo diretamente com a viabilidade do parasita e não pela interação com as citocinas analisadas.

Nossos dados mostram que o T4C (100 mg/Kg) direta ou indiretamente diminui a quantidade de parasitas disponíveis para invasão tecidual, no entanto, nas doses avaliadas induzem a perda de peso e é tóxica na dose de 200 mg/Kg.

## 6 CONCLUSÕES

- O tratamento de camundongos com dose única de 100 mg/Kg de T4C diminuiu significativamente o pico parasitêmico no 8º dia após a infecção. No entanto, as outras doses testadas (30, 50 ou 200 mg/Kg) ou até mesmo o tratamento prolongado (10 ou 40 mg/Kg dia) não apresentaram nenhum efeito sobre a parasitemia.
- O tratamento prolongado de T4C (10 mg/Kg dia) aumentou a sobrevivência de animais infectados (valor de  $p$  que consideramos significativo em relação ao controle,  $p=0,058$ ), provavelmente devido ao seu efeito antioxidante, como relatado na literatura.
- O tratamento com T4C em dose única (200 mg/Kg) reduziu o peso corporal dos animais sem infecção. Além disso, houve redução de 20 e 40% da sobrevivência de animais que receberam dose única ou prolongada, respectivamente.
- A análise histológica mostrou uma diminuição significativa na carga parasitária apenas no intestino de animais tratados com T4C (dose única de 150 mg/Kg). A PCR $q$  confirmou estes dados e também mostrou o mesmo efeito no intestino de animais tratados por período prolongado apenas com a dose menor (10 mg/Kg dia).
- A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, avaliadas por PCR $q$ , não foram afetadas pelo tratamento com T4C, nos órgãos analisados (coração, intestino e baço). Esses dados indicam o não envolvimento desta droga com essa via imunológica para controle da parasitemia sanguínea e tecidual e, portanto, reforçam a nossa hipótese inicial.
- A redução na carga parasitária no intestino correlaciona positivamente com a diminuição de parasitas circulantes. No entanto, não há qualquer correlação com a sobrevivência. Esses dados em conjunto, sugerem que T4C, em um determinado intervalo de doses (provavelmente devido ao efeito hormético) diminui direta ou indiretamente, a quantidade de parasitas disponíveis para a invasão tecidual (intestino).

## REFERÊNCIAS\*

Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 1996 Nov;84(2):231-44.

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005 Sep-Oct;52(5):399-451.

Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol*. 1999 Aug;92(4):263-74.

Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*. 2007 Apr-May;59(4-5):274-9.

Andrade SG, Macedo V. Combined treatment of Chagas' disease with Bayer 2502 and corticoid (experimental and clinical study). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1973 Nov-Dec;15(6):421-30.

Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):3515-9.

Bakker BM, Walsh MC, ter Kuile BH, Mensonides FI, Michels PA, Opperdoes FR, et al. Contribution of glucose transport to the control of the glycolytic flux in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31;96(18):10098-103.

Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5160-1.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Benchimol-Barbosa PR. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: Steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. *Int J Cardiol.* In press 2009.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Jr., Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.* 2007 Nov 14;298(18):2171-81.

Bice DE, Zeledon R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J Parasitol.* 1970 Aug;56(4):663-70.

Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. *Am J Dis Child.* 1976 Jan;130(1):97-103.

Bohler S, Wagner K, Bassler KH. Metabolism of *L*-thiazolidine-4-carboxylic acid. *Infusionstherapie.* 1989 Apr;16(2):82-6.

Bonaldo M, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* 1988 April 1, 1988;106(4):1349-1358.

Bookout, AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ. High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds. *Current Protocols in Molecular Biology.* 4 th ed. Boston: JohnWiley & Sons; 2003. Vol. 3, 15.8

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.* 2010 Jun;14(6B):1373-84.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997 Oct;114(2):103-10.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.

Brener Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv Pharmacol Chemother.* 1975;13:1-81.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop. Sao Paulo.1962;Nov-Dec;4:389-96.

Brener, Z.; Chiari, E. Observations on the chronic phase of experimental Chagas' disease in mice. Rev Inst Med Trop.1963;5:128-32.

Caldas RA, Araujo EF, Felix CR, Roitman I. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 1980 Apr;66(2):213-6.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964 May-Jun;12:93-100.

Campos ES. Estudos sobre uma raça neurotópica de *Trypanosoma cruzi*. Ann Fac Med São Paulo. 1927;2:197-201.

Campos MA, Gazzinelli RT. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm. 2004 Jun;13(3):139-43.

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

Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002 Jan-Feb;44(1):29-37.

Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, Miranda MR, Colli W, Alves MJ, et al. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2005 Jun 1;247(1):65-71.

Cannata JJ, Cazzulo JJ. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B. 1984;79(3):297-308.

Canto C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. Trends Endocrinol Metab. 2009 Sep;20(7):325-31.

Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology. 2007 Dec;122(4):584-95.

Carneiro VT, Caldas RA. Regulatory studies of L-glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp Biochem Physiol B. 1983;75(1):61-4.

Castro C, Macedo V, Rezende JM, Prata A. [Longitudinal radiologic study of the esophagus, in an endemic area of Chagas disease, in a period of 13 years]. Rev Soc Bras Med Trop. 1994 Oct-Dec;27(4):227-33.

Castro MAP, Brener Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 1985;36:233-9.

Cazzulo JJ, de Cazzulo BM, Higa AI, Segura EL. NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B. 1979;64(1):129-31.

Cazzulo JJ, Juan SM, Segura EL. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B. 1977;56(3):301-3.

Cazzulo JJ. Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Subcell Biochem. 1992a;18:235-57.

Cazzulo JJ. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. FASEB J. 1992b Oct;6(13):3153-61.

Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 1994 Apr;26(2):157-65.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159-218.

Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degrave WM, et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*. 2005 Oct;58(1):46-60.

Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, et al. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):15484-94.

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

Corrales M, Cardozo R, Segura MA, Urbina JA, Basombrio MA. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr;49(4):1556-60.

Correa R, Blanco B, Del Rio M, Victor V, Guayerbas N, Medina S, et al. Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors*. 1999;10(2-3):195-200.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3-24.

Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(4):549-54.

Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Jun;129(1):53-9.

De la Fuente M, Ferrandez MD, Del Rio M, Sol Burgos M, Miquel J. Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Dev*. 1998 Sep 1;104(3):213-25.

De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des*. 2009;15(26):3003-26.

Deane LM. Animal Reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1964 Jan-Mar;16:27-48

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation. 1956 Dec;14(6):1035-60.

Dias JC. [General aspects of the prevention of Chagas' disease in Brazil]. Rev Paul Med. 1984 Nov-Dec;102(6):279-81.

Dias LC, Dessoay MA, Silva JJN, Thiemann O, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos (Artigo em destaque como capa da revista). Química Nova (Impresso). 2009;32:2444-57.

Diniz Lde F, Caldas IS, Guedes PM, Crepalde G, de Lana M, Carneiro CM, et al. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jul;54(7):2979-86.

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

Doyle PS, Zhou YM, Engel JC, McKerrow JH. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Nov;51(11):3932-9.

Duschak VG, Cazzulo JJ. Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 1991 Oct 1;67(2):131-5.

Duschak VG, Couto AS. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2007 Jan;2(1):19-51.

Elthon TE, Stewart CR. Effects of the Proline Analog *l*-Thiazolidine-4-carboxylic Acid on Proline Metabolism. Plant Physiol. 1984 Feb;74(2):213-8.

Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1998 Aug 17;188(4):725-34.

Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:695-729.

Fairlamb AH, Opperdoes FR. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes, with special reference to the glycosome. In: Morgan MJ, editor. *Carbohydrate metabolism in cultured cells*: Plenum Publishing Corporation; 1986.183–224.

Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol.* 1999 Aug;34(5):675-85.

Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jan;53(1):174-9.

Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1359-64.

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.

Frydman B, de los Santos C, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-13C]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO<sub>2</sub> fixation reactions. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 11;192(2):363-8.

Galvao Da Silva AP, Jacysyn JF, De Almeida Abrahamsohn I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology.* 2003 Feb;108(2):230-7.

Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 1992 Mar 15;148(6):1792-6.

Golgher D, Gazzinelli RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*. 2004 Aug;37(5):399-409.

Gosalvez M. Thioprolone and reversal of cancer. *Lancet*. 1983 May 14;1(8333):1108.

Guedes PM, Urbina JA, de Lana M, Afonso LC, Veloso VM, Tafuri WL, et al. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Nov;48(11):4286-92.

Gutierrez-Correa J, Fairlamb AH, Stoppani AO. [Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by phenothiazine cationic free radicals]. *Rev Argent Microbiol*. 2001a Jan-Mar;33(1):36-46.

Gutierrez-Correa J, Fairlamb AH, Stoppani AO. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. *Free Radic Res*. 2001b Apr;34(4):363-78.

Hanson WL, Roberson EL. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Protozool*. 1974 Oct;21(4):512-7.

Hoare CA. The classification of mammalian trypanosomes. *Ergeb Mikrobiol Immunitatsforsch Exp Ther*. 1966;39:43-57.

Hoff R, Mott KE, Milanesi ML, Bittencourt AL, Barbosa HS. Congenital Chagas's disease in an urban population: investigation of infected twins. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72(3):247-50.

Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 1998 Mar;66(3):1208-15.

Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):4075-83.

Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool. 1989 Mar-Apr;36(2):150-3.

Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1997 Apr 1;158(7):3311-6.

Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:95-7.

Juan SM, Cazzulo JJ, Segura EL. Inhibition of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by sulfhydryl reagents. Comp Biochem Physiol B. 1979;63(4):531-5.

Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Inhibition of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by silver nitrate. Experientia. 1979 Sep 15;35(9):1139-40.

Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. Int J Biochem. 1978;9(6):395-400.

Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. Nat Rev Drug Discov. 2005 Jun;4(6):489-99.

Kierszenbaum F. Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* infection by passive antibody transfer. J Parasitol. 1980 Aug;66(4):673-5.

Kirchhoff LV. Chagas'Disease (American Trypanosomiasis): A Tropical Disease Now Emerging in the United States In: Scheld WM, Craig WM, Hughes JM, editors. Emerging Infections-3. Washington: ASM Press; 1999. p. 111-34.

Kitani K, Kanai S, Miyasaka K, Carrillo MC, Ivy GO. The necessity of having a proper dose of (-)deprenyl (D) to prolong the life spans of rats explains discrepancies among different studies in the past. Ann N Y Acad Sci. 2006 May;1067:375-82.

Knowles SE, Ballard FJ. Effects of amino acid analogues on protein synthesis and degradation in isolated cells. Br J Nutr. 1978 Sep;40(2):275-87.

Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* 2003 Feb 1;17(3):313-21.

Krassner SM, Flory B. Proline metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool.* 1972 Nov;19(4):682-5.

Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 1976 Mar;116(3):755-60.

Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1998 May;20(5):207-16.

Lamour N, Riviere L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP, Bringaud F. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11902-10.

Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2003 Jul 31;349(5):474-85.

Lo Presti MS, Rivarola HW, Bustamante JM, Fernandez AR, Enders JE, Fretes R, et al. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Jun;23(6):634-6.

Maeda H, Gleiser CA, Masoro EJ, Murata I, McMahan CA, Yu BP. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: II. Pathology. *J Gerontol.* 1985 Nov;40(6):671-88.

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.

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

Marin Neto JA, Simoes MV, Sarabanda AV. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 1999 Mar;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 Jul;77(7):3023-32.

Masoro EJ. The role of hormesis in life extension by dietary restriction. *Interdiscip Top Gerontol*. 2007;35:1-17.

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 Apr;146(4):601-20.

Mazza S, Montaña A, Benitez C, Juzin E. Transmission del "*Schyzotripanum cruzi*" al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Publ Mepra*. 1936;28:41-6.

McCabe RE, Mullins BT. Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and importance of oxygen-independent killing. *J Immunol*. 1990 Mar 15;144(6):2384-8.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*. 1989 May-Jun;5(3):155-71

Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol*. 1978 Jun;64(3):475-82.

Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001 Nov;159(5):1723-33.

Miquel J, Fleming J, Economos AC. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila*. *Arch Gerontol Geriatr*. 1982 Sep;1(2):159-65.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Dec;100(8):663-77.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(Suppl 1):17-30.

Montemartini M, Bua J, Bontempi E, Zelada C, Ruiz AM, Santome JA, et al. A recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi* has both tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase activities. *FEMS Microbiol Lett*. 1995 Nov 1;133(1-2):17-20.

Montemartini M, Santome JA, Cazzulo JJ, Nowicki C. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1993 Jun 15;292(Pt 3):901-6.

Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Jun 1;93(2):203-14.

Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, Cohn Z. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 1979 May 1;149(5):1056-68.

Navarro A, Sanchez-Pino MJ, Gomez C, Bandez MJ, Cadenas E, Boveris A. Dietary thioproline decreases spontaneous food intake and increases survival and neurological function in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jan;9(1):131-41.

Neafsey PJ. A Mathematical Modeling Approach to Characterize Hormesis, Caloric Restriction and Toxicity in Mortality Data from Toxicity Studies. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2008;3(1):80-92.

Nickell SP, Stryker GA, Arevalo C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J Immunol*. 1993 Feb 15;150(4):1446-57.

Nowicki C, Hunter GR, Montemartini-Kalisz M, Blankenfeldt W, Hecht H, Kalisz HM. Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Apr 7;1546(2):268-81.

Obungu VH, Kiaira JK, Njogu RM, Olembo NK. Catabolism of proline by procyclic culture forms of *Trypanosoma congolense*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1999 May;123(1):59-65.

Paes, LV. Caracterização molecular e bioquímica da prolina desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*, um possível alvo terapêutico [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010

Paulino M, Iribarne F, Dubin M, Aguilera-Morales S, Tapia O, Stoppani AO. The chemotherapy of chagas' disease: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2005 May;5(5):499-519.

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 Aug 28;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 Nov 6;554(1-2):201-5.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.

Pinto Dias JC. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med*. 2006 May 16;144(10):772-4.

Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2007 Feb 14;115(3):279-83.

Rassi Jr. A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402.

Ratner S, Clarke HT. The action of formaldehyde upon cysteine. *J Am Chem Soc*. 1937;59:200-9.

Reed SG, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Shanebeck K, Conlon PJ, et al. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *J Exp Med*. 1987 Dec 1;166(6):1734-46.

Reed SG. *In vivo* administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*. 1988 Jun 15;140(12):4342-7.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med*. 2000 Aug;6(8):890-7.

Rivarola HW, Fernandez AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Suligoy M, et al. Thioridazine treatment modifies the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999 Oct;93(7):695-702.

Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;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 Feb;126(2):219-30.

Rottenberg ME, Bakhiet M, Olsson T, Kristensson K, Mak T, Wigzell H, et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*. 1993 Dec;61(12):5129-33.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Imperio Lima MR, et al. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2006 Apr;74(4):2031-42.

Saul N, Pietsch K, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CE. The longevity effect of tannic acid in *Caenorhabditis elegans*: Disposable Soma meets hormesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Jun;65(6):626-35.

Schmidt A, Krauth-Siegel RL. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem*. 2002 Nov;2(11):1239-59.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102(Suppl 1):75-85.

Schubert MP. Compounds of thiol acids with aldehydes. *J Biol Chem*. 1936;114:341-50.

Scorza C, Scorza JV. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972 May-Jun;14(3):171-7.

Shimokawa I, Yu BP, Higami Y, Ikeda T, Masoro EJ. Dietary restriction retards onset but not progression of leukemia in male F344 rats. *J Gerontol*. 1993 Mar;48(2):B68-73.

Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W, Alves MJ. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. 2002 Nov-Dec;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 Mar;5(1):53-64.

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 Nov;168(1):102-8.

Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol*. 1973;20:405-17.

Smith DA, Schmid EF. Drug withdrawals and the lessons within. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2006 Jan;9(1):38-46.

Soares MJ, De Souza W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1988 Apr;20(2):349-61.

Stevens JL, Baker TK. The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. *Drug Discov Today*. 2009 Feb;14(3-4):162-7.

Suo M, Mukaisho K, Shimomura A, Sugihara H, Hattori T. Thioproline prevents carcinogenesis in the remnant stomach induced by duodenal reflux. *Cancer Lett*. 2006 Jun 18;237(2):256-62.

Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B*. 1976;55(3B):443-7.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol*. 2007 May;Chapter 14:Unit 14.12.

Taliaferro WH, Pizzi T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 1955 May-Jun;96(3):199-226.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):338-40.

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol*. 1996 Jan;8(1):13-22.

Ter Kuile BH, Opperdoes FR. A chemostat study on proline uptake and metabolism of *Leishmania donovani*. *J Protozool*. 1992 Sep-Oct;39(5):555-8.

Tetaud E, Barrett MP, Bringaud F, Baltz T. Kinetoplastid glucose transporters. *Biochem J*. 1997 Aug 1;325(Pt 3):569-80.

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 Aug;6(8):733-41.

Torrice F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*. 1991 May 15;146(10):3626-32.

Tsuda M, Hirayama T, Sugimura T. Presence of N-nitroso-L-thioprolin and N-nitroso-L-methylthioprolins in human urine as major N-nitroso compounds. *Gann*. 1983 Jun;74(3):331-3.

Tsuda M, Hirayama T, Sugimura T, Kakizoe T. A new type of N-nitrosamino acid, N-nitroso-L-thioprolin and N-nitroso-L-methylthioprolins, found in human urine as major N-nitroso compounds. *IARC Sci Publ*. 1984(57):87-94.

Tsuda M, Kurashima Y. Nitrite-trapping capacity of thioprolin in the human body. *IARC Sci Publ*. 1991(105):123-8.

Tsuda M, Kurashima Y, Kosaka H, Ohshima H, Sugimura T, Esumi H. Marked increase in urinary excretion of nitrate and N-nitrosothioprolin in the osteogenic disordered syndrome rats, lacking ascorbic acid biosynthesis, by administration of lipopolysaccharide and thioprolin. *Carcinogenesis*. 1995 Nov;16(11):2653-7.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001 May 1;31(5-6):472-81.

Utrecht J. Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. *Drug Discov Today*. 2003 Sep 15;8(18):832-7.

Unger L, DeMoss RD. Action of a proline analogue, *l*-thiazolidine-4-carboxylic acid, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1966b Apr;91(4):1556-63.

Unger L, DeMoss RD. Metabolism of a proline analogue, *l*-thiazolidine-4-carboxylic acid, by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1966a Apr;91(4):1564-9.

Urbina JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1994 Mar;10(3):107-10.

Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lizardi K, et al. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science*. 1996 Aug 16;273(5277):969-71.

Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, et al. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jul;42(7):1771-7.

Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartroli J. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2498-502.

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

Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Jan;21(1):27-38.

Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2379-87.

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

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;3:276-94.

Vray B, De Baetselier P, Ouaiissi A, Carlier Y. *Trypanosoma cruzi* but not *Trypanosoma brucei* fails to induce a chemiluminescent signal in a macrophage hybridoma cell line. *Infect Immun*. 1991 Sep;59(9):3303-8.

Walter RD, Ebert F. Evidence for NADH- and NADPH-linked glutamate dehydrogenases in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Protozool*. 1979 Nov;26(4):653-6.

Weber HU, Fleming JF, Miquel J. Thiazolidine-4-carboxylic acid, a physiologic sulfhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine. Arch Gerontol Geriatr. 1982 Dec;1(4):299-310.

Weindruch R, Naylor PH, Goldstein AL, Walford RL. Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. J Gerontol. 1988 Mar;43(2):B40-2.

Wizel B, Nunes M, Tarleton RL. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. J Immunol. 1997 Dec 15;159(12):6120-30.

Zeledon R, Rabinovich JE. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu Rev Entomol. 1981;26:101-33.

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 Oct;46:541-51.