

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

## 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.

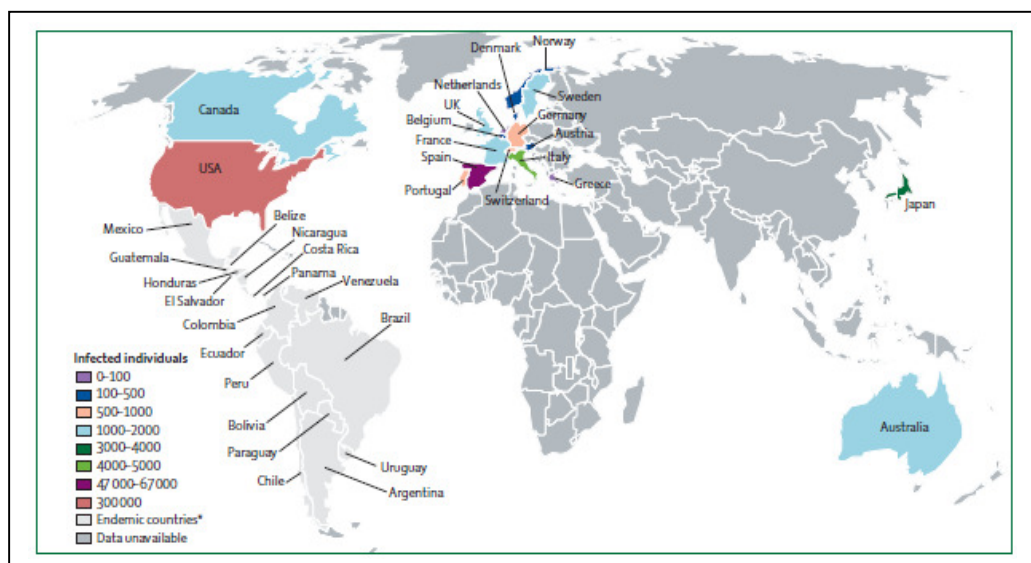
**Keyword:** *Trypanosoma cruzi*. T4C. Proline. Metabolism

# 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).

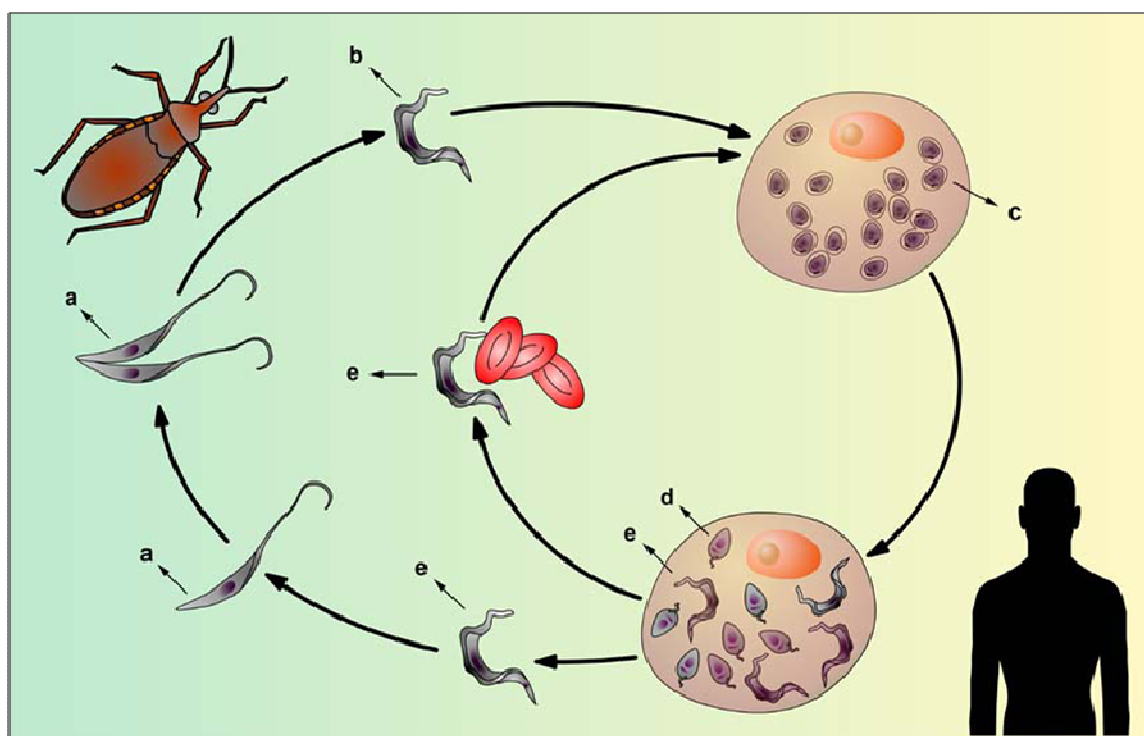
A doença é transmitida ao homem e para mais de 150 espécies de mamíferos, principalmente pelo inseto vetor hematófago da subfamília Triatominae por meio dos ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre (Deane, 1964). Os três insetos vetores mais importantes na transmissão do *Trypanosoma cruzi* ao homem 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 a células infectadas (Nickell et al., 1993; Wizel et al., 1997).

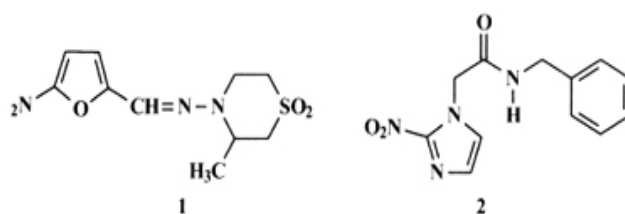
Está bem demonstrada também, a importância dos anticorpos para o controle da infecção crônica por *T. cruzi*. Quando o soro de pacientes chagásicos ou de camundongos foi inoculado em camundongos naïves, tanto a parasitemia quanto a mortalidade foram reduzidas após o desafio com *T. cruzi* (Krettli e 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 quimioterápicos. 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 Oppendoes, 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 metaciclogênese (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 tripomatigotas metacíclicos (metaciclogênese), 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 metaciclo gênese 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**

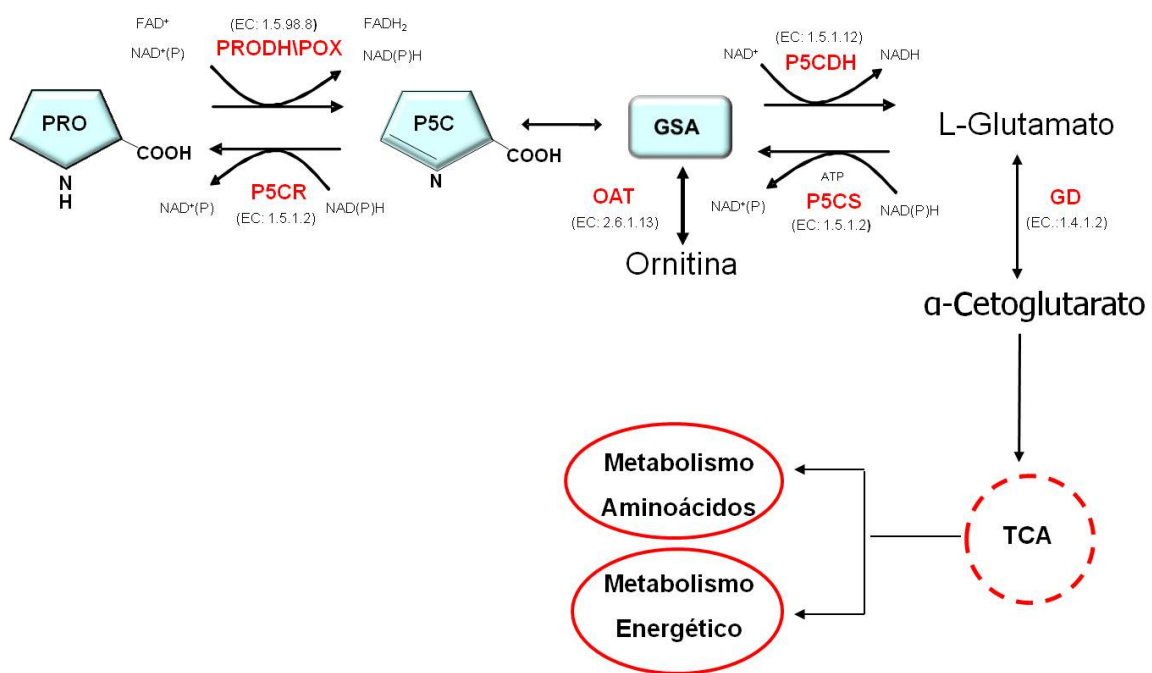
A prolina em particular, atua como um importante osmoprotetor, participando da resposta ao estresse osmótico quando o *T. cruzi* circula em diferentes ambientes como o tubo digestivo do inseto, o sangue do hospedeiro mamífero ou o citoplasma da célula hospedeira. Além desses processos, a prolina é um 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).

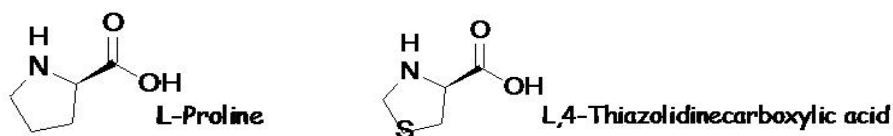


Figura 5. Representação estrutural de prolina e seu análogo T4C.

### 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 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 tripanozomiaze 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, Lazard 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.