INGA EVA STIK LANGE

Estudo dos efeitos dos psicofármacos acamprosato e
levomepromazina sobre as formas epimastigotas e
tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi in vitro*

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.

Versão original

São Paulo
2012

INGA EVA STIK LANGE

Estudo dos efeitos dos psicofármacos acamprosato e
levomepromazina sobre as formas epimastigotas e
tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi in vitro*

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno - Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Lange, Inga Eva Stik.

Estudo dos efeitos dos psicofármacos acamprosato e levomepromazina sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* in vitro / Inga Eva Stik Lange. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular e metabolismo de tripanosomatídeos

Versão do título para o inglês: Study of the effects of acamprosate and levomepromazine psychodrugs in epimastigotes and tripomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. GABA 3. Acamprosato 4. Metabolismo 5. Levomepromazina I. Silber, Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB052/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Inga Eva Stik Lange.

Título da Dissertação: Estudo dos efeitos dos psicofármacos acamprosato e levomepromazina sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* *in vitro*.

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

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

() **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) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 282, referente ao projeto intitulado: "*Estudo dos efeitos de psicofármacos gabaérgicos sobre o ciclo vital do Trypanosoma cruzi in vitro*" sob a responsabilidade de Inga Eva Stik Lange, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de dezembro de 2008.

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

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

**Aos meus pais, Karin e Dagny, pelo
amor e zelo incondicionáveis**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao querido Ariel, pelo aprendizado, persistência, amizade e humanismo envolvidos em nosso trabalho durante todo esse período. Simplesmente nosso ‘Maximmus’!

A minha família; vocês foram o estímulo do início e uma ajuda constante, concreta e infatigável ao longo desses e de todos os anos da minha vida!

À Anahí, por ter me conduzido ao laboratório e colaborado instigantemente ao meu aprendizado pessoal e acadêmico.

À Beth, nosso anjo protetor do laboratório, que cuida de todos nós e do laboratório com todo zelo. Quanto prazer em tê-la por perto e pela amizade compartilhada!

À vanguarda da equipe do Ariel, que tive a honra de poder aprender e fazer verdadeiras amizades; Lisvane, Brian, Josué, novamente Anahí...obrigada por tudo mesmo!

Aos meus queridos colegas companheiros dessa aventura; Sandrinha, Jean, Julie, Flavinha Zimbres, Flavinha Damasceno, Marcel, Denise.

À jovem guarda da equipe; Higo, Letícia, Raissa. Boa sorte em suas jornadas e obrigada pela companhia!

Ao prof. Carsten e seus alunos; Yasmin, Kamila, Thales. Não pudemos ter melhores colegas para dividir o mesmo espaço!

Aos meus amigos e ao Alexandre; obrigada por terem proporcionado momentos inenarravelmente alegres, tantas estórias inesquecíveis, e, também, por terem suportado o mal-humor, as tristezas, as angústias e desesperos no dia-a-dia de convivência.

Agradeço a todos os colegas, funcionários e professores do ICB que colaboraram e me apoiaram durante esses anos!

A jornada pareceu longa e árdua.

O desânimo tentou se apossar inúmeras vezes

Porém, todas essas dificuldades são mais facilmente transpostas quando, além dos nossos próprios passos, outros pés compartilham também desta jornada.

RESUMO

LANGE, IES. Estudo dos efeitos dos psicofármacos acamprosato e levomepromazina sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. [dissertação (Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012

A doença de Chagas é causada por um parasita protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, que circula na natureza entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo esses últimos os responsáveis pelas vias mais relevantes de transmissão natural. Existem duas drogas para o tratamento da doença de Chagas, descobertas umas quatro décadas atrás: o Nifurtimox e o Benznidazol. Os resultados mais promissores utilizando essas drogas foram observados na fase aguda da doença. Por outro lado, alguns estudos apontam dados interessantes em relação com o uso do benzonidazole em pacientes adultos na fase crônica da infecção. Porém, a eficiência do tratamento durante a fase crônica da doença, quando a maior parte dos pacientes é diagnosticada, é controversa. Além disso, as drogas mencionadas apresentam sérios efeitos secundários devido à sua toxicidade, o que frequentemente coloca em risco a continuidade do tratamento comprometendo seu sucesso. Perante este quadro, fazem-se necessários a continuação dos esforços na busca e compreensão de novas vias e processos que possam ser utilizados como alvos para novas drogas, assim como a sua validação. Nosso laboratório vem trabalhando no metabolismo de ácido γ -aminobutírico (GABA), um projeto derivado de estudos da via prolina – glutamato em *T. cruzi*. Um trabalho prévio mostrou a ocorrência de GABA no citoplasma de formas epimastigotas, assim como a incorporação desse aminoácido em *T. cruzi*. A partir desses dados, abriu-se uma linha orientada a explorar as possíveis atividades tripanocidas de drogas já em uso para os tratamentos de diferentes psicopatologias, com especial ênfase em análogos de GABA. Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos de duas drogas de uso em psiquiatria, acamprosato e levomepromazina, em diferentes aspectos da biologia do *T. cruzi*. O acamprosato e a levomepromazina apresentaram uma IC_{50} contra formas epimastigotas de 2,50 μ M e 405 μ M, respectivamente. Nenhuma das drogas mostrou capacidade de interferir com os mecanismos de resistência ao estresse por pH, oxidativo ou térmico. Só a levomepromazina mostrou ser capaz de interferir com a recuperação dos parasitas após serem submetidos a estresse metabólico utilizando como substratos para a recuperação dos níveis energéticos tanto glicose quanto aminoácidos. Ambas as drogas foram relativamente pouco tóxicas em células CHO-K₁ (IC_{50} =1mM em ambos casos). Finalmente, ambas as drogas mostraram sensibilidades maiores quando utilizadas para o tratamento de formas infectivas (tripomastigotas), sendo os IC_{50} obtidos de 70 μ M para acamprosato e 336 μ M para levomepromazina. O presente trabalho abre novas perspectivas na utilização de estratégias *piggy back chemotherapy* (busca de novas indicações para drogas já existentes no mercado) e assinala a levomepromazina e o acamprosato como compostos líderes para o desenho de novas drogas com capacidade terapêutica contra o *T. cruzi* otimizada.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. GABA. Acamprosato. Metabolismo. Levomepromazina

ABSTRACT

LANGE, IES. Study of the effects of acamprosate and levomepromazine psychodrugs in epimastigotes and tripomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. [master thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012

Chagas' disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which cycle in nature involves both, vertebrate and invertebrate hosts. Among the latter are the responsible for the most relevant pathways of natural transmission. Chagas' disease is endemic in the Americas, where it covers a geographic area going from the southern territory of the United States up to the province of Chubut in Argentina. Presently, there are two drugs for the treatment of Chagas' disease, both discovered about four decades ago: nifurtimox and benznidazole. The most promising results using these drugs were observed in the acute phase of the disease. Besides, some studies are stressing the advantages of using benznidazole to treat the chronic phase of Chagas' disease in adult patients. However, the efficiency of treatments against the chronic phase of the disease, when most of patients are diagnosed, is at least controversial. Both drugs, also presents serious side effects due to their toxicity, which often lead the patients to interrupt the chemotherapy, compromising the success of treatment. In this context, it is necessary to continue looking for new pathways and processes able to be used as targets for new drugs. Our laboratory has been working on the metabolism of the γ -aminobutyric acid (GABA) in *T. cruzi*, a project derived from previous studies on the proline – glutamate pathway in this organism. A previous work from our group showed the occurrence of GABA in the epimastigotes cytoplasm, as well as the incorporation of this amino acid into *T. cruzi* cells. From these data, a research line was open, oriented to evaluate the trypanocide activities of drugs already in use for treating human psychopathologies, with special focus on GABA analogues. In this context, the main goal of this work was to evaluate the effects of two drugs currently being used for psychiatric treatments, acamprosate and levomepromazine, in different aspects of the *T. cruzi* biology. Both drugs, acamprosate and levomepromazine, showed an IC_{50} against epimastigote forms of 2,50 μM e 405 μM , respectively. None of the drugs was able to interfere with mechanisms related to the resistance to pH, oxidative or thermal stress. Only levomepromazine interfered with the recovery of parasites after being submitted to metabolic stress, using glucose or amino acids as substrates to recover the energy levels after the starvation. Both drugs showed low toxicity in CHO-K₁ cells (IC_{50} =1mM for both drugs). Finally, both drugs showed a highest sensitivity when used for the treatment of the infective forms (trypomastigotes), with IC_{50} values of 70 μM for acamprosate and 336 μM for levomepromazine. The present work opens new perspectives on piggy back chemotherapy strategies (looking for new prescriptions for drugs already existing in the market), and point levomepromazine and acamprosate as leading compounds to design new drugs with optimized therapeutic characteristics against *T. cruzi*.

Keyword: *Trypanosoma cruzi*. GABA. Acamprosate. Metabolism. Levomepromazine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2- Metabolismo de GABA.....	8
Figura 3- Estruturas químicas de acamprosato, GABA e glutamato.....	13
Figura 4- Estrutura química da levomepromazina.....	14
Figura 5- Crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença ou não de diferentes concentrações de acamprosato e de levomepromazina.....	22
Figura 6- Efeito combinado do estresse de pH com acamprosato ou levomepromazina.....	24
Figura 7- Efeito combinado do estresse de temperatura com acamprosato e com levomepromazina.....	25
Figura 8- Efeito combinado do estresse metabólico com levomepromazina.....	27
Figura 9- Efeito combinado do estresse oxidativo com acamprosato e com levomepromazina.....	28
Figura 10- Representação gráfica da viabilidade celular (CHO-K ₁) após 48h de incubação na presença ou não de acamprosato e de levomepromazina.....	29
Figura 11- Representação gráfica de tripomastigotas contados no 5°.dia de infecção de CHO-K ₁ na presença ou não de acamprosato e de levomepromazina.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Acamprosato
ALAT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ASAT	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BZD	Benzodiazepínico
BZN	Benzonidazol
cDNA	DNA complementar
CHO-K ₁	Linhagem celular proveniente de ovário de hamster Chinês
d.p.i.	Dias pós infecção
DL ₅₀	Dose-Letal 50 %
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAg	DNA genômico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido γ -amino butírico
GABA-T	Ácido γ -amino butírico transaminase
GAD	Glutamato descarboxilase
GAT	Glutamato transaminase
Glu	Glutamato
GSA	Glutamato semi-aldeído
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada

5-HT ₂	serotonina
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gama
IgM	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCL	Cloreto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	Liver Infusion Tryptose
LM	Levomepromazina
log	Logarítmico
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromotetrazolium)
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio monobásico anidro
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NFX	Nifurtimox
NH ₂	Grupo amino
NH ₃	Amônia
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PRO	Prolina
ProDH	Prolina desidrogenase
RNA	Ácido ribonucleíco
RNA _m	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease

SDS	Sódio dodecil sulfato
SFB	Soro fetal bovino
TAT	Tirosina aminotransferase
TAU	Urina artificial de triatomíneo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TryR	Trypanothione reductase

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>18</u>
1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas	18
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.3 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	20
1.4 Generalidades sobre o metabolismo energético em <i>T. cruzi</i>	21
1.5 Os aminoácidos em <i>T. cruzi</i>	22
1.6 A via GABA – glutamato	24
1.6.1 Glutamato em <i>T.cruzi</i>	24
1.6.2 Metabolismo de GABA	25
1.7 A Quimioterapia em uso contra a doença de Chagas	27
1.8 O uso de psicofármacos como tripanocidas	29
1.8.1 Acamprosato: um análogo de GABA.....	29
1.8.2 Outros psicofármacos como tripanocidas.....	30
<u>2 OBJETIVOS.....</u>	<u>32</u>
<u>3 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>33</u>
3.1 Microorganismos utilizados no trabalho.....	33
3.1.1 Célula hospedeira	33
3.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
3.2 Manutenção das células hospedeiras	33
3.3 Obtenção de parasitas	33
3.3.1 Epimastigotas	33
3.3.2 Tripomastigotas de cultivo.....	33
3.4 Avaliação da inibição do acamprosato ou levomepromazina no crescimento da forma epimastigota de <i>T. cruzi in vitro</i>	34
3.5 Avaliação da interação do acamprosato com os mecanismos de resistência a diferentes tipos de estresse na forma epimastigota.....	34
3.5.1 Condição de estresse de pH em epimastigotas.....	35

3.5.2 Condição de estresse térmico em epimastigotas	35
3.5.3 Condição de estresse metabólico em epimastigotas.....	35
3.5.4 Condição de estresse oxidativo em epimastigotas	36
3.6 Toxicidade dos psicofármacos em células de mamíferos	36
3.6.1 Ensaio de MTT	36
3.7 Avaliação da interferência dos compostos na infectividade do tripomastigota sobre as células hospedeiras.....	37
3.8 Análises estatísticas.....	37
<u>4 RESULTADOS.....</u>	<u>38</u>
4.1 Avaliação da inibição do acamprosato e levomepromazina no crescimento da forma epimastigota de <i>T. cruzi in vitro</i>	38
4.2 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e estresse de pH em epimastigotas	40
4.3 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e estresse térmico em epimastigotas	41
4.4 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e o estresse metabólico em epimastigotas	43
4.5 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e o estresse oxidativo em epimastigotas Condição de estresse oxidativo em epimastigotas	44
4.6 Avaliação da toxicidade de Ac e LM em culturas de células CHO-K ₁	45
4.7 Avaliação da interferência dos compostos na infectividade do tripomastigota sobre as células hospedeiras.....	47
<u>5 DISCUSSÃO.....</u>	<u>48</u>
<u>6 CONCLUSÕES</u>	<u>56</u>
<u>7 REFERÊNCIAS.....</u>	<u>57</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

Sendo considerada a zoonose de maior acometimento na América Latina, a doença de Chagas estende-se desde o Sul dos Estados Unidos, onde Woody e Woody observaram o primeiro caso em Corpus Christi, no Texas, até a província de Chubut, na Argentina, onde casos da doença foram assinalados casos por Carcavallo e Martinez (Rassi, Rassi et al., 2010). A doença de Chagas tornou-se uma problemática social e econômica com forte incidência no Brasil, onde já foi considerada endêmica em todos os seus estados, desde Ceará até o Rio Grande do Sul (Brener, 1973). É, porém, na América do Sul que o problema da tripanossomose humana ganha mais relevância, quer pela difusão ampla dos vetores, quer pelos altos índices de infecção observados em muitas áreas, quer pela gravidade que a doença assume (<http://www.who.int/tdr>).

A principal via de transmissão da doença de Chagas acontece através do vetor triatomíneo, da família *Reduviidae*, sendo que *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* constituem as espécies de maior importância epidemiológica . Atualmente, a principal forma de transmissão da doença de Chagas em áreas urbanas acontece através da transfusão de sangue contaminado, cujo risco é de 20% (Rassi, Rassi et al., 2010). Outras vias de transmissão bem demonstradas acontecem através dos transplantes de órgãos provenientes de pacientes infectados, da transmissão congênita (gestação e aleitamento), e da transmissão acidental em laboratório (Bittencourt, 1992; Moncayo, 1999; Dias, 2009). Finalmente, foi descrita a aparição de casos por transmissão oral, à qual vem se atribuindo uma importância epidemiológica cada vez maior.

Essa patologia é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase crônica, por sua vez, se subdivide em indeterminada (assintomática) e sintomática (Docampo, 2001; Urbina, Docampo, 2003b). A fase aguda representa uma infecção generalizada causada pelo parasito, na qual o indivíduo infectado apresenta uma alta parasitemia e pode apresentar sintomas inespecíficos da doença como febre, dor de cabeça, enfartamento ganglionar e edema bipalpebral no sítio de inoculação (sinal de Romaña). Durante a fase aguda, que pode

durar algumas semanas, o paciente não apresenta anticorpos específicos ou desenvolve uma resposta imune humoral incipiente onde predominam tipicamente anticorpos de tipo IgM. A fase aguda evolui para a fase crônica, que pode perdurar desde meses até toda a vida do indivíduo infectado. A fase crônica define-se pela ausência de uma parasitemia evidente, e uma resposta imune humoral robusta, com predominância de anticorpos de tipo IgG. A forma indeterminada da fase crônica se caracteriza por ser assintomática. Já na forma sintomática os pacientes manifestam alterações fisiológicas importantes e sintomas persistentes no sistema cardíaco e digestório. A patologia cardíaca é caracterizada pela miocardite crônica evoluindo para cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e tromboembolismos. A forma digestiva consiste na dilatação do esôfago e/ou megacólon. Em alguns pacientes, ambas as formas acontecem simultaneamente, caracterizando a forma cardiodigestiva. Finalmente, em pacientes imunodeprimidos, pode acontecer alterações no sistema nervoso periférico (Pinto Dias, 1990; Prata, 1994; Boscardin, Torrecilhas et al., 2010).

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae ordem Kinetoplastida. O *T. cruzi*, como os demais Kinetoplastida, apresenta um conjunto de características estruturais peculiares, algumas das quais são descritas a seguir:

1. a presença de uma única mitocôndria em forma de túbulos que percorre a totalidade da célula;
2. a presença de uma estrutura rica em DNA denominado kDNA, sendo este aproximadamente o 20% do DNA total da célula, constituindo o genoma mitocondrial;
3. a presença de glicossomos, organelas derivadas dos peroxissomos, onde a primeira fase da via glicolítica acontece;
4. a existência de reservossomos em algumas fases do ciclo de vida (epimastigotas), onde há alta atividade de hidrolases e as proteínas são armazenadas como substância de reserva;
5. a presença de acidocalcissomos, organelas acídicas com alta concentração de fósforo -pirofosfato e polifosfato - complexado com Ca^{2+} e outros íons.

O parasita apresenta quatro formas majoritárias descritas na literatura: epimastigota e tripomastigota metacíclico (encontrados no tubo digestivo do inseto vetor), amastigota (intracelular) e tripomastigota (presentes na circulação sanguínea dos

hospedeiros mamíferos) (Brenner, 1973). No inseto vetor, predominam os epimastigotas, formas replicativas, não infectivas, que se originam as formas tripomastigotas metacíclicas, infectivas mas não replicativas. Já no hospedeiro mamífero, predominam no sangue e no meio extracelular as formas tripomastigotas, geralmente pleomórficas, não replicativas (Tyler, Engman, 2001). O *T. cruzi* deve obrigatoriamente invadir as células do hospedeiro mamífero para diferenciarem-se em amastigotas, formas replicativas. Outras formas evolutivas intermediárias também têm sido descritas ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. A forma epimastigota intracelular, detectada no citoplasma das células infectadas do hospedeiro vertebrado e em culturas de tecidos, aparece de maneira transiente entre os estágios amastigota e tripomastigota (Almeida-De-Faria, Freymuller et al., 1999). Além disso, no intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas, durante sua diferenciação em epimastigotas, passam por uma forma intermediária descrita como esferomastigota (De Souza, 1984). Todos esses estágios do ciclo de vida do parasito podem ser identificados a partir de características morfométricas, tais como a forma do parasito e a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região pela qual o flagelo emerge (Hoare, 1966).

1.3 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O *T. cruzi*, apresenta várias formas ao longo do seu ciclo de vida, tanto no inseto vetor quanto no hospedeiro mamífero. No inseto vetor, os epimastigotas se replicam e, na porção terminal do tubo digestório, diferenciam-se para formas tripomastigotas metacíclicas. Esse processo de diferenciação (metaciclogênese) é disparado por estímulos ambientais. Os tripomastigotas metacíclicos são eliminados junto com os dejetos do inseto quando ele se alimenta de sangue do hospedeiro mamífero (repasto sanguíneo), podendo entrar em contato com a lesão produzida pela picada. Essa é uma das vias de entrada deste parasita no hospedeiro mamífero. Por serem formas não replicativas, os tripomastigotas devem se diferenciar para formas replicativas a fim de estabelecer a infecção. Isto acontece após a invasão das células hospedeiras e locação dos parasitas no citoplasma celular, onde se diferenciam em amastigostas. Após a replicação por fissão binária, os amastigostas diferenciam-se transientemente em epimastigotas intracelulares, e posteriormente em tripomastigotas sanguíneos. Os tripomastigotas eclodem das células, ganham o meio extracelular, e, eventualmente, a corrente sanguínea, podendo invadir outros tecidos do hospedeiro ou ser ingeridos pelo

inseto vetor dando início a um novo ciclo (**Figura 1**) (Brener, 1973; Tyler, Engman, 2001; Brack, 1968; De Souza, 1984).

Figura 1- Esquema do ciclo de vida de *T. cruzi*. Formas epimastigotas replicativas e não infectivas presentes no inseto vetor (a). Tripomastigotas metacíclicos, formas infectivas eliminadas nos dejetos do hospedeiro invertebrado (b). Ao invadirem as células do hospedeiro vertebrado os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas (c). O parasita passa por estágio transiente denominado epimastigota intracelular(d), o qual se diferencia em tripomastigota sanguicola (e). Estes podem se disseminar através da corrente sanguínea do mamífero completando o ciclo de vida ao se diferenciar novamente em epimastigotas no hospedeiro invertebrado contaminado

FONTE: Boscardin , Torrecilhas et al, 2010

1.4 Generalidades sobre o metabolismo energético em *T. cruzi*

Os tripanosomatídeos transitam por diferentes ambientes (exemplo: o trato intestinal do inseto, o sangue do hospedeiro vertebrado e o citoplasma celular do hospedeiro). A sua sobrevivência depende da sua habilidade para manter a homeostase intracelular de íons e nutrientes e de catabolizar diferentes substratos para obter energia. Provavelmente por isso, os tripanosomatídeos têm desenvolvido evolutivamente um metabolismo intermediário flexível, pelo qual são capazes de utilizar carboidratos e aminoácidos como fontes de carbono e energia (Cazzulo, 1992; 1994; Silber, Colli et al., 2005a). A glicólise em *T. cruzi* apresenta características diferenciadas em relação a outros eucariontes. Em muitos organismos a transição da anaerobiose para a aerobiose é acompanhada por uma rápida diminuição na taxa de utilização de glicose. Esta inibição

do fluxo glicolítico pela presença do oxigênio é conhecida como “efeito Pasteur”. No entanto, neste organismo, não se verifica a ocorrência do “efeito Pasteur”, ou seja, ocorrem taxas parecidas do consumo de glicose tanto em anaerobiose quanto em condições aeróbicas, o que é característico de um metabolismo do tipo fermentativo. Devido a este fato, propuseram-se os termos “fermentação aeróbica” ou “fermentação succínica” da glicose para descrever o processo de oxidação da glicose (Cazzulo, 1992; 1994). Mesmo em condições aeróbicas, a glicose é degradada incompletamente, resultando em uma mistura final de CO₂, ácidos mono e dicarboxílicos, dos quais o succinato representa cerca de 70%, e pequenas quantidades de acetato e piruvato. Quando existe consumo massivo de aminoácidos, esses metabólitos são desaminados através de uma rede de aminotransferases, ou de desidrogenases, o que pode gerar um excesso de NH₃. O NH₃ pode ser reincorporado em α -cetoglutarato é posteriormente transferido para piruvato por transaminação, rendendo alanina. Isso ocorre apesar desses parasitos terem ativos a via glicolítica, o Ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons (Cannata, Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1984; Cazzulo, Franke De Cazzulo et al., 1985; Coustou, Biran et al., 2008).

1.5 Os aminoácidos em *T. cruzi*

O metabolismo energético do *T. cruzi* baseia-se na degradação de glicose (disponível no sangue do hospedeiro) e de aminoácidos, que são oxidados através do ciclo de Krebs. Em particular, foi mostrada a relevância do metabolismo de asparagina, glutamato, aspartato, glutamina, leucina, isoleucina e prolina no *T. cruzi* (Zeledon, 1960; Sylvester, Krassner, 1976). A glicose é obtida através do meio extracelular por um sistema de transporte específico (Tetaud, Bringaud et al., 1994). Por sua vez, os aminoácidos podem ser obtidos através da síntese *de novo*, transporte desde o meio extracelular ou da degradação de proteínas (Silber, Colli et al., 2005a). Acredita-se que os aminoácidos capazes de serem oxidados para a obtenção de energia, principalmente prolina, aspartato, glutamato, entre outros, são oxidados via ciclo de Krebs, ao qual ingressam através da sua desaminação em oxalacetato ou α -cetoglutarato (Sylvester, Krassner, 1976; Lisvane Silva, Mantilla et al., 2011)

É importante destacar que aminoácidos também foram envolvidos em outros processos tais como diferenciação (Contreras, Salles *et al.*, 1985; Homsy, Granger *et al.*, 1989; Tonelli, Silber *et al.*, 2004b), osmorregulação (Rohloff, Rodrigues et al.,

2003), e crescimento e resistência do parasita ao estresse (Pereira, Alonso, Ivaldi et al., 2002; Pereira, Alonso et al., 2003). A arginina, por exemplo, é relevante na administração dos recursos energéticos da célula, podendo ser convertida em fosfoarginina na presença da arginina quinase (Pereira, Alonso et al., 2000), e no metabolismo do NO₂ (Peluffo, Piacenza et al., 2004). Este sistema está envolvido nos processos que demandam grandes quantidades de energia como o crescimento celular e a sobrevivência em condições de estresse (Pereira, Alonso, Torres et al., 2002; Pereira, Alonso et al., 2003). A prolina particularmente está envolvida em todos eles, sendo um aminoácido importante para a metaciclologênese (Contreras, Salles et al., 1985; Homsy, Granger et al., 1989) e a diferenciação intracelular (Tonelli, Silber et al., 2004a). A enzima prolina racemase, que converte L- em D- prolina, também desempenha um papel importante na diferenciação entre os estágios do *T. cruzi* (Chamond, Gregoire et al., 2003; Chamond, Goytia et al., 2005). Sabe-se ainda que a leucina e a isoleucina inibem a enzima prolina oxidase (PO) – primeira enzima do catabolismo da prolina – e também a indução da metaciclologênese pela prolina (Contreras, Salles et al., 1985; Homsy, Granger et al., 1989).

O transporte dos aminoácidos é o primeiro passo para o seu metabolismo. Os primeiros transportadores de aminoácidos foram descritos bioquimicamente em *T. cruzi* por Hampton (Hampton, 1970; 1971). Posteriormente, vários trabalhos relataram a presença de vários sistemas cinéticos de transporte para vários aminoácidos com diferentes especificidades. O transporte de arginina, glutamato, aspartato e prolina foram estudados com bastante detalhe. A arginina é ativamente transportada por pelo menos dois sistemas de transporte, um de alta e outro de baixa afinidade (Pereira, Alonso et al., 1999; Canepa, Silber et al., 2004). O transporte da prolina acontece através 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, Marcipar et al., 2002). O transportador de glutamato em *T. cruzi* apresenta algumas semelhanças bioquímicas ao transportador de prolina de alta afinidade, porém, a atividade de transporte de prolina não é competida pelo glutamato, e a de transporte de glutamato não é competida pela prolina, mostrando tratar-se de sistemas diferentes (Silber, Rojas et al., 2006). Um análogo estrutural do glutamato é o aminoácido γ -aminobutírico (GABA). Ao se realizar experimentos de competição do transporte de glutamato na presença de GABA, surpreendentemente observou-se que esse aminoácido tinha a capacidade de aumentar a velocidade de transporte de glutamato (Silber, dado não

publicado). Isso fez com que fosse levantada a hipótese da presença de um receptor ou um transportador de GABA na membrana do *T. cruzi* que foi confirmada mediante ensaios de incorporação de GABA radioativamente marcado (Silber, Rojas et al., 2006). A existência de um transportador de GABA poderia estar indicando a participação deste aminoácido em processos relacionados à biologia e ao metabolismo do *T. cruzi*.

1.6 A via GABA – glutamato

1.6.1 Glutamato em T.cruzi

Glutamato é um metabólito intermediário entre prolina e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Krassner e Flory, 1972; Ter Kuile e Oppendoes, 1992; Obungu, Kiara et al., 1999; Lamour, Riviere et al., 2005) e está juntamente com a alanina e o aspartato diretamente envolvido no fornecimento de intermediários do ciclo de Krebs (Silber et al., 2005).

Em mamíferos, sabe-se que o glutamato participa na indução e término de sinapses, migração, diferenciação e morte celular, além de exercer função sinalizadora de órgãos e tecidos periféricos (Danbolt, 2001). Como mencionado, o glutamato pode ter seu grupo $-NH_2$ transferido a vários cetoácidos, dentre eles piruvato, através das enzimas componentes de uma robusta rede de transaminação: tirosina aminotransferase (TAT), alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT), produzindo α -cetoglutarato, e alanina ou aspartato (Cazzulo, 1994). Glutamato pode ser desaminado também por alguma das duas enzimas glutamato desidrogenases (Cazzulo, De Cazzulo et al., 1979) que possuem localização citoplasmática e mitocondrial, respectivamente (Duschak, Cazzulo, 1991). Ainda, a presença de uma prolina oxidase e pirrolina-5-carboxilato desidrogenase tinha sido indiretamente demonstrada através da habilidade destes parasitas para oxidar prolina. Mais recentemente, a presença dessas enzimas e o seu envolvimento em diferentes aspectos da biologia do parasita, tais como produção de ATP e participação na metaciclologênese, foram demonstradas pelo nosso grupo (trabalho de doutoramento da Dr^a Lisvane Paes). Esta via metabólica envolve obrigatoriamente o glutamato como intermediário metabólico importante no metabolismo de *T.cruzi* (Silber, Colli et al., 2005a; Lisvane Silva, Mantilla et al., 2011).

1.6.2 Metabolismo de GABA

Em muitos organismos, GABA é um aminoácido importante, metabolicamente relacionado com o glutamato. Além das suas funções metabólicas, o ácido γ -aminobutírico (identificado há mais de 50 anos), é o mais abundante dentre os neurotransmissores inibidores do sistema nervoso central distribuído amplamente no cérebro dos mamíferos. GABA é biossintetizado através da descarboxilação do ácido glutâmico (Glu) pela enzima ácido glutamato descarboxilase (GAD) dependente de piridoxal fosfato. Sua metabolização se deve a uma sequência de reações de GABA-transaminase (GABA-T) e da semialdeído succínico desidrogenase (SSDH), que resulta em succinato e fornece intermediários para o ciclo do ácido tricarboxílico que pode ser ressintetizado a glutamato (GABA *shunt*) (Hassel, Johannessen et al., 1998). No genoma do *T. cruzi* não existe evidência da enzima GABA aminotransferase. Porém, foi anotado um gene putativo - aldeído deidrogenase (Tc00.1047053507641.60)- que poderia ter participação no catabolismo de GABA com redução de succinato semialdeído a succinato. (**Figura 2**)

Figura 2– Metabolismo de GABA. Via transaminação de GABA, utilizando α -cetoglutarato gerando succinato semialdeído (a). O gene anotado como putativo possui um domínio que participaria do catabolismo de GABA. O succinato semialdeído pode ser reduzido a succinato; substrato do ciclo de krebs e da cadeia respiratória (b)

FONTE: (<http://www.genome.jp/kegg/>)

GABA em outros organismos

O aminoácido GABA está presente em muitos organismos procariontes e eucariontes.

Em protozoários induz a diferenciação terminal do ciclo de vida através de um receptor de GABA (Anjard, Loomis, 2006). Segundo Ramoino (2005) moléculas relacionadas ao sistema de receptores GABA têm função reguladora da motilidade em *Paramecium*. Em insetos, tem sido estudada a sua função, porém ainda é pouco conhecida a sua participação no metabolismo, como é o caso da *Drosophila melanogaster* (Enell, Hamasaka et al., 2007).

GABA como neurotransmissor

Quando age como neurotransmissor, GABA regula a excitabilidade neuronal através da ligação com proteínas de membrana específicas o que resulta na abertura de canais iônicos. A regulação da concentração de GABA é crítica para a sua função no sistema nervoso central. Essa concentração depende da expressão da enzima GAD, sendo que a sua desregulação pode levar a uma superexcitação do sistema glutamatérgico (antagônico ao GABAérgico). Esse quadro pode levar não somente a sintomas associados da epilepsia, mas também está relacionada a algumas doenças neurológicas como a esquizofrenia, ansiedade, depressão, fobia, Coreia de Huntington, Parkinson, Alzheimer, demência senil e a desordens de movimentos (esclerose múltipla, tremores, discinesia tardia).

GABA age no sistema nervoso central através de receptores específicos que, quando reconhecem e ligam-se nesse neurotransmissor, induzem a entrada de íons cloreto, levando a uma hiperpolarização da célula recipiente e cessando a transmissão de impulsos nervosos a outras células. Os receptores de GABA são comumente divididos em três grupos: receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C. Os receptores GABA_A são heterogêneos, compreendendo uma família que abrange 21 subunidades clonadas e seqüenciadas arranjadas pentamericamente, classificados em 8 isoformas de acordo com o parentesco seqüencial: α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3} . As formas mais comuns são α , β e γ . GABA atua no receptor GABA_A aumentando a condutância iônica de cloreto transmembrana estabilizando ou hiperpolarizando o potencial do restante da membrana. Sabe-se que os receptores GABA_A estão envolvidos nas desordens de ansiedade e os

benzodiazepínicos são conhecidos como moduladores alostéricos positivos desses receptores (Gajcy et al, 2010).

O segundo subtipo de receptor identificado foi GABA_B que são receptores metabotrópicos com sinalização decorrente da ativação das proteínas G heterotriméricas (LeVine, 1999). É composto por duas subunidades: GABA_{B1} (com as isoformas GABA_{B1a} e GABA_{B1b}) e GABA_{B2}. Os receptores GABA_B são seletivamente ativados pelo R- baclofen e insensíveis a bicuculina e moduladores de GABA_A (Kerr, 1995).

A terceira classe de receptores de GABA é designada GABA_C por compreender os receptores com distintas características farmacológicas por não serem bloqueados por bicuculina e nem modulados por baclofen, barbitúricos, BZDs ou esteróides neuroativos (Gajcy, Lochynski et al., 2010).

O desenvolvimento de análogos de GABA com potenciais ações psicotrópicas, consiste na manipulação desta molécula aumentando a sua lipofilicidade e enriquecimento de suas estruturas através da inserção de anéis, indução de colapso hidrofóbico e formação de pontes de hidrogênio intramoleculares (Gajcy, Lochynski et al., 2010). Sobre a base do extenso conhecimento da química das interações entre GABA e seus receptores, principalmente os receptores neuronais, uma miríada de drogas tem sido desenvolvidas, algumas das quais mostraram ter atividades relacionadas com o aumento da atividade das sinapses GABAérgicas. Muitas dessas drogas estão disponíveis no mercado para uso em humanos, tendo sido estudados suas doses de uso, farmacocinética e farmacodinâmica, toxicidade e efeitos secundários. Isto fornece uma verdadeira caixa de ferramentas para a busca de drogas já aprovada para uso em humanos com capacidade de interferir no metabolismo de GABA em *T. cruzi*.

1.7 A Quimioterapia em uso contra a doença de Chagas

Por volta do início da década de 1970, dois compostos surgiram: o nifurtimox (Lampit®, da Bayer), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido; e o benzonidazol (Rochagan®, da Roche), *N*-benzyl-2-nitroimidazol acetamida. Evidências indicam que o nifurtimox e benzonidazol atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (NO₂) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (-NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH⁺ citocromo P₄₅₀ redutase,

leva à formação de um intermediário nitro-radical ($R\text{-NO}_2\cdot$) com subsequente formação de hidroxilamina ($R\text{-NHOH}$). No caso do nifurtimox, o radical reduz o oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido ($O_2\cdot^-$) e regenerando o grupo NO_2 num processo conhecido como ciclo redox. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxila ($\cdot OH$). A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*. Por outro lado, o benzonidazol não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*). O radical nitro formado estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (e.g., DNA e citocromo P_{450}). É descrito ainda que esse fármaco aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama ($IFN\text{-}\gamma$ - *interferon-gamma*), e inibe o crescimento do *T. cruzi* através da enzima $NADH^+$ -fumarato redutase.

Os resultados mais promissores utilizando essas drogas foram observados na fase aguda da doença com o uso de nifurtimox durante um período de 60 a 90 dias. Por outro lado, alguns estudos apontam dados interessantes em relação com o uso do benzonidazole em pacientes adultos na fase crônica da infecção. Os melhores resultados foram obtidos no Cone Sul da América do Sul (região sul do Brasil, Argentina e Chile) devido provavelmente ao tipo de cepa de *T. cruzi* predominante nesta região (Dias, 2009). Porém, apesar desses dados, o tratamento terapêutico da doença de Chagas continua sendo insatisfatório devido a que na maioria dos casos a doença é diagnosticada durante a fase crônica, fase na qual os medicamentos em uso (inclusive o benzonidazole) são considerados pouco eficientes. A ação desses fármacos é afetada diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes. Além disso, fatores adversos como a alta toxicidade e a emergência de linhagens do parasita resistentes às drogas constituem sérias desvantagens dos tratamentos existentes.

Dentre as características desejáveis para o tratamento específico contra a infecção por *T. cruzi* devem se considerar que deve ser capaz de: eliminar o parasita das pessoas infectadas, diminuir a probabilidade da evolução da patologia cardíaca ou digestiva, cortar a cadeia de transmissão do parasita, reduzir o índice de nascidos infectados e aumentar o número de doadores de sangue e órgãos

(<http://www.who.int/tdr>). Além disso, é altamente desejável, que as drogas apresentem baixa toxicidade, sejam administráveis por via oral e em dose única. Neste sentido, o mecanismo de ação de uma grande variedade de compostos ativos contra o *T. cruzi* tem sido investigados a nível bioquímico, em cultura de tecido e no hospedeiro *in vivo*.

1.8 O uso de psicofármacos como tripanocidas

1.8.1 Acamprosato: um análogo de GABA

Como mencionado, estudos sobre transporte de aminoácidos em *T. cruzi* mostraram que o glutamato é capaz de influenciar positivamente a incorporação de GABA do meio extracelular. Levantou-se, então, a hipótese de que o parasita possui uma via para o metabolismo de GABA. Desta forma, foi considerado relevante avaliar o possível efeito anti-*T. cruzi* de um análogo estrutural de GABA com potencial para interferir no metabolismo de glutamato. É o caso do acamprosato (*bis*-acetilhomotaurinato de cálcio), composto similar estruturalmente ao GABA, utilizado clinicamente no tratamento de dependência alcoólica há duas décadas.

O mecanismo de ação do acamprosato não está totalmente elucidado, uma vez que os estudos orientados a elucidar essa questão são discordantes entre si. Esta droga parece atuar sobre distintos sistemas de neurotransmissão implicados na dependência alcoólica. Um dos primeiros estudos sugere a capacidade do acamprosato de reestabelecer a transmissão e a atividade GABAérgica, aumentando a população de receptores de GABA no hipocampo de ratas álcool-dependentes (Daoust, Saligaut et al., 1987). Em termos gerais, este fármaco provavelmente reduz a hiperexcitabilidade neuronal que aparece durante a desintoxicação alcoólica.

Estudos posteriores, mostraram que o acamprosato aumenta também os níveis séricos e cerebrais de serotonina (5-hidroxitriptamina) (Nalpas, Dabadie et al., 1990). Por outro lado, tem se comprovado que durante a instalação da dependência alcoólica o número de receptores NMDA dependentes aumenta, permitindo a entrada de cálcio ao citosol, causando a excitação neuronal (Guerri, Grisolia, 1983; Sakimura, Kutsuwada et al., 1995; Fadda, Rossetti, 1998; Faingold, N'gouemo et al., 1998).

Figura 3- Estruturas químicas de acamprosato, GABA e glutamato; similaridade entre os compostos

FONTE: (Dahchour, De Witte et al., 1998)

1.8.2 Outros psicofármacos como tripanocidas

Os fármacos antipsicóticos são utilizados para o tratamento de quase todas as formas de psicose como nos quadros de esquizofrenia, quadros afetivos, transtornos esquizo-afetivos, que cursam com sintomas psicóticos e psicoses associadas a doenças mentais orgânicas. Também têm sido indicados como ansiolíticos ou sedativos em pacientes com grande risco de desenvolver dependência a BZDs, sendo que se deve considerar também o risco de ocorrência de discinesia tardia para alguns compostos. Porém, existem poucas evidências, mesmo que empíricas, para o tratamento das insônias crônicas com antipsicóticos (Krystal et al, 2004). Outro psicofármaco interessante não relacionado a GABA, também avaliado neste trabalho: a levomepromazina (**Figura 4**).

Fenotiazinas

As fenotiazinas são compostos tricíclicos com atividade antipsicótica. Dentre elas, a levomepromazina, a tioridazina e a trifluoperazina foram avaliadas em tripanossomatídeos mostrando em alguns casos resultados promissores. A Levomepromazina é uma droga utilizada no tratamento das psicoses como a

esquizofrenia. Trata-se de um composto tricíclico das fenotiazinas usado clinicamente no tratamento da esquizofrenia e desordens esquizoafetivas. Suas propriedades sedativas são utilizadas para o cuidado intensivo psiquiátrico. Primeiramente a levomepromazina foi descrita como sendo um neuroléptico antidepressivo, devido a sua potente ação bloqueadora de serotonina (5-HT₂). Este composto já tinha sido avaliado em *Leishmania* spp. e sabe-se que possui efeito inibitório da TryR, enzima específica do sistema de defesa redox dos tripanosomatídeos (Iribarne, Paulino et al., 2009). A Tioridazina, descrita como inibidora de TryR *in vitro* (Gutierrez-Correa, Fairlamb et al., 2001) é capaz de reduzir a parasitemia, aumentar a sobrevida e prevenir os danos cardíacos em modelos murinos da doença de Chagas aguda (Rivarola, Fernandez et al., 1999). Porém, não foi atingida a cura parasitológica e a seletividade da ação da droga contra o TryR do parasita não foi demonstrada. Outra fenotiazina interessante é a Trifluoperazina, antagonista da calmodulina foi descrita também como inibidora da cadeia respiratória, causando colapso do potencial de membrana mitocondrial em *T. cruzi* (Vercesi, Bernardes et al., 1991; Vercesi, Hoffmann et al., 1991).

Figura 4- Estrutura química da levomepromazina

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos do acamprosato e da levomepromazina em diferentes aspectos da biologia do *Trypanosoma cruzi* *in vitro*.

Os objetivos específicos propostos são os seguintes:

Avaliar o efeito do análogo de GABA e da levomepromazina sobre o crescimento de formas epimastigotas e sobre a diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese).

Avaliar a interação desses fármacos com os mecanismos de resistência a diferentes tipos de estresse (metabólico, térmico, de pH e oxidativo) de formas epimastigotas na presença dos compostos em estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microorganismos utilizados no trabalho

3.1.1 Célula hospedeira

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

3.1.2 *Trypanosoma cruzi*

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

3.2 Manutenção das células hospedeiras

Células da linhagem CHO-K₁ foram cultivadas a 37 °C em meio RPMI 1640 (Cultilab) acrescido com 10% de SFB (Cultilab), 0,15% (m/v) de NaHCO₃, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.3 Obtenção de parasitas

3.3.1 *Epimastigotas*

As formas epimastigotas extracelulares de *T. cruzi*, cepa CL, clone 14 (Brener, Chiari, 1963) foram mantidas em fase exponencial de crescimento a 28 °C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) que contém infusão de fígado 5,0 g/L, Triptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCL 0,4 g/L, Na₂HPO₄ 8,0 g/L, glicose 2 g/L, hemina 10 g/L suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e pH ajustado a 7,4 (Camargo, 1964).

3.3.2 *Tripomastigotas de cultivo*

As células CHO-K₁ foram infectadas com 3×10^7 tripomastigotas por garrafa (75 cm²) em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e incubadas a 37 °C durante 5 hs, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂, como descrito por Tonelli, Silber *et al.*, (2004a). Após 5 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e acrescidas de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e incubadas durante 24 hs nas mesmas condições descritas acima. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS, acrescidas de meio RPMI 1640 contendo 2% de SFB e incubadas a 33 °C. Os parasitos foram coletados entre 5°-10° dia pós infecção, contados em câmara de Neubauer e utilizados em experimentos posteriores.

3.4 Avaliação da inibição do acamprosato ou levomepromazina no crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* *in vitro*

Para os ensaios dos compostos foram utilizados parasitas da cepa CL, clone-14, sendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) pH 7,4, contendo 10% de soro bovino fetal a 28 °C mantidos em crescimento exponencial a cada 48 horas (Camargo, 1964). As formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram transferidas para placas de cultura de 96 poços (200 µl/poço). Cada poço foi suplementado ou não (controles) com os compostos propostos dissolvidos em PBS e esterilizados por filtração em membranas de 0,22 µm de tamanho de poro. As concentrações de acamprosato (acamprosato de cálcio, Sigma Aldrich) utilizadas variaram de 0,0625 µM a 2,5 µM e 405 µM a 1,215 mM para levomepromazina (Togrel®, Ivax). Essas concentrações foram escolhidas a partir de concentrações de uso já relatadas na literatura destes compostos para outros organismos.

O crescimento celular foi estimado por leitura da absorbância em 620 nm (DO₆₂₀) durante dez dias consecutivos. A absorbância das placas foi convertida em valores de densidade celular (células/mL) mediante a obtenção de curvas de correlação entre densidade celular e DO₆₂₀ como descrito (Magdaleno, Ahn et al., 2009). A equação de regressão linear utilizada ($R^2=0,99551$) foi:

$$y = 0,36 x$$

sendo x a DO₆₂₀ medida espectrofotometricamente, e y a densidade celular de formas epimastigotas, expressa em número de células/ml. Como controle positivo de inibição foi utilizada uma combinação de rotenona (20 µM) e antimicina (0,5 µM).

3.5 Avaliação da interação do acamprosato com os mecanismos de resistência a diferentes tipos de estresse na forma epimastigota

Uma vez determinada a IC₅₀ e IC₂₅ nos ensaios descritos anteriormente, foram aplicados diferentes tipos de estresse na forma epimastigota para a avaliação da resistência do parasita, como: pH, temperatura, metabólico e oxidativo.

3.5.1 Condição de estresse de pH em epimastigotas

Partindo-se de $2,5 \times 10^6$ epimastigotas/mL para cada poço, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS e resuspenso em meio LIT de acordo com a seguinte alteração de pH: 5,5, 6,5 e 7,5; mantidas as outras condições iguais para cada composto. As concentrações de acamprosato e levomepromazina utilizadas foram as respectivas IC_{25} , de forma a analisar a ocorrência de sinergismo por parte do psicofármaco à situação de estresse. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 620 nm durante os 10 dias consecutivos. As curvas doses - resposta foram construídas mediante a utilização dos dados do 5º dia de crescimento (aproximadamente metade da fase exponencial de crescimento).

3.5.2 Condição de estresse térmico em epimastigotas

Nesta condição, foram utilizados $2,5 \times 10^6$ epimastigotas/mL para cada poço com adição de distintas concentrações das drogas ao meio LIT totalizando 200 µL de solução/poço. Foram montadas três placas de 96 poços nas mesmas condições para cada droga, cada uma incubada a distintas temperaturas: 28, 33 e 37 °C, mimetizando as condições de estresse de temperatura que o parasita encontra na natureza quando transita entre o hospedeiro invertebrado e o hospedeiro vertebrado. A leitura das absorbâncias a 620 nm foi feita a cada 24 h até completar 10 dias, com representação gráfica do 5º dia de crescimento.

3.5.3 Condição de estresse metabólico em epimastigotas

Outro experimento realizado consistiu em submeter os parasitas a um estresse metabólico. Desta maneira, avaliou-se o efeito dos compostos sobre a viabilidade do parasita na presença ou ausência (controle) de glutamato, L-prolina, GABA e glicose como fonte de energia. Nesse experimento, $2,5 \times 10^6$ epimastigotas/mL foram lavados duas vezes, resuspenso em PBS e incubados por 48 horas em PBS na presença ou ausência de 3 mM de L-prolina, 3 mM de glutamato e 3 mM de glicose, com ou sem 202,50 µM de levomepromazina ou 1,250 mM, respectivas IC_{25} . Após esse tempo, a viabilidade celular foi determinada sobre a base de medição da atividade oxidante de

enzimas mitocondriais. Além disso, a morfologia e a motilidade das células também foram monitoradas em microscopia óptica.

3.5.4 Condição de estresse oxidativo em epimastigotas

Para a realização deste ensaio algumas condições foram padronizadas. Primeiramente, diferentes concentrações de H_2O_2 foram testadas, obtendo-se curvas dose-resposta. Os epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^6 células/mL) foram incubados em PBS com diferentes concentrações de H_2O_2 entre 0 e 200 μM durante 90min a 28 °C. Essas células foram então lavadas duas vezes com PBS por centrifugação e ressuspensas em LIT. Ao 5° dia de incubação, mantidos a 28 °C, foi realizada a leitura por espectrofotômetro em 620nm. Desta forma, a metade da concentração máxima inibitória (CI_{50}) de H_2O_2 foi determinada em 100 μM .

A experimentação da interação dos compostos com o estresse oxidativo fora realizada mediante a lavagem de epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^6 células/mL) por centrifugação duas vezes com PBS, ressuspensos em seguida em PBS suplementado ou não com 100 μM de H_2O_2 na presença ou não de IC_{25} de Ac ou LM. Após 90 min de incubação a 28 °C, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em LIT, sendo aliquotadas em placas de 96 poços. Ao 5° dia de crescimento, foi realizado a leitura por espectrofotômetro em 620nm e, então, os dados foram graficados e analisados estatisticamente (processo realizado em triplicata).

3.6 Toxicidade dos psicofármacos em células de mamíferos

3.6.1 Ensaio de MTT

A viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* foi estimada através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromotetrazolium), segundo Molinari et al. (2003). Em resumo, foram agregados a 100 μL das células ressuspensas em PBS, 30 μL de MTT (5 mg/mL). Posteriormente as placas foram incubadas a 28 °C durante 5 horas (sob proteção da luz). A reação foi interrompida com a adição de 100 μL de SDS 10 %. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento de uma cor azul homogênea de formazan resultante da redução do tetrazolium. As placas foram deixadas *overnight* e então as leituras da absorbância foram feitas em um comprimento de onda de 595 nm usando como referência 690 nm.

3.7 Avaliação da interferência dos compostos na infectividade do tripomastigota sobre as células hospedeiras

As células CHO-K₁ foram infectadas com 3×10^7 tripomastigotas por garrafa (75 cm²) em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e incubadas a 37 °C durante 5 horas, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Tonelli, Silber *et al.*, 2004b). Após 5 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi acrescido meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e incubadas durante 24 horas nas mesmas condições descritas acima. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS, acrescidas de meio RPMI 1640 contendo 2% de SFB e incubadas a 33 °C. Os parasitas foram coletados entre 5º dia pós-infecção, contados em câmara de Neubauer e utilizados em experimentos posteriores com a finalidade de analisar o efeito dos compostos na infectividade dos tripomastigotas. Células CHO-K₁ foram mantidas em placas de 24 poços com meio RPMI 10% SFB a 37°C, CO₂ 5% para serem infectadas com tripomastigotas pré-incubados por 2 hs, em distintas concentrações de droga, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB a 37 °C. Uma vez infectadas, as células permaneceram em contato com os parasitas durante 5 h e, então, foram lavadas duas vezes com PBS e acrescido meio RPMI 2% SFB. A cada 24h, as células foram lavadas com PBS e adicionado novo meio. No 5º. dia pós infecção os tripomastigotas sobrenadantes foram contados em câmara de Neubauer .

3.8 Análises estatísticas

Para analisar o sinergismo entre os dois tratamentos independentes (H₂O₂ e acamprosato/levomepromazina) o teste de ANOVA de duas vias foram realizados como descrito por Slinker (1998). Nos demais ensaios o método ANOVA de uma via de acordo com o teste de Dunnet's foi usado nas análises estatísticas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da inibição do acamprosato e levomepromazina no crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* *in vitro*

Com o intuito de avaliar a capacidade inibitória do crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* pelas drogas em avaliação, curvas de crescimento foram realizadas a diferentes doses de levomepromazina (LM) e acamprosato (Ac) (**Figura 5**). Em ambos os casos foram utilizados controles positivo (culturas suplementadas com uma mistura de rotenona e antimicina inibitória do crescimento) e negativo (culturas suplementadas com PBS) para a inibição do crescimento. Nas concentrações em que as drogas mostraram atividade, observou-se uma diminuição dose-dependente da inclinação da curva de crescimento durante a fase exponencial. Interessantemente, no caso do tratamento com LM foram observadas alterações nos valores de densidade celular atingidos na fase estacionária, diferentemente do que aconteceu quando as culturas foram tratadas com Ac.

Devido ao fato das drogas mostrarem seu maior efeito durante a fase exponencial das culturas, escolheu-se um ponto próximo da fase exponencial média (5º. dia) para avaliar quantitativamente o efeito dose-resposta (**Figura 5, inserto**). A concentração de Ac que inibiu 50% do crescimento do parasito (CI₅₀) foi de 2,25 µM e a de LM foi de 405 µM, mediante ajuste dos dados a uma regressão não linear a uma função de regressão logística sigmoidal.

Figura 5-Crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* na presença ou não de diferentes concentrações de acamprosato e de levomepromazina . As células ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL) foram semeadas em meio LIT em placas de cultura de 96 poços. Diferentes culturas foram acrescidas com diferentes concentrações de acamprosato ou levomepromazina, e a evolução das culturas foi monitorada cada 24 hs por espectrofotometria. As leituras foram transformadas em valores de densidade celular mediante o uso de uma curva de calibração adequada. A partir dos valores da densidade celular do 5º dia de crescimento, foi construída a curva dose-resposta de cada droga (inserto em cada gráfico), obtendo-se a concentração inibitória de 50 % dos parasitas, chegando no valor de $2,50 \pm 0,574 \mu\text{M}$ para acamprosato (A) e de $405 \pm 5,485 \mu\text{M}$ (B)

4.2 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e estresse de pH em epimastigotas

Foram avaliadas as curvas de crescimento do *T.cruzi* em diferentes condições de pH, 5.5, 6.5 e 7.5, no 5º.dia, simulando as diferenças ambientais às quais o parasita é submetido durante seu ciclo de vida. Sobre essa condição, doses de IC₂₅ de Ac e LM foram adicionadas às diferentes culturas mantidas em diferentes pHs com o propósito de avaliar o efeito sinérgico ou antagônico das mesmas em relação ao estresse imposto.

Foi estabelecido que o pH ótimo de proliferação das formas epimastigotas é 7.5 (Brenner, 1973). Não foi surpreendente então que o crescimento do parasita foi reduzido significativamente quando cultivado em pH 5.5, demonstrando-se que esta condição é estressante para o crescimento do parasita. É interessante lembrar que este pH é menor que o pH do trato digestório do inseto (5,9 - 8,9), que por sua vez não é constante (já que depende do período de repasto sanguíneo) (Kollien, Schaub, 1998).

Ao comparar o crescimento das culturas a pH 6,5, observou-se um aumento na densidade celular em relação ao grupo controle (pH 7,5). Pode-se sugerir que a exposição das células a um pH sutilmente mais baixo daquele do grupo controle poderia favorecer o gradiente de H⁺ através da membrana plasmática do parasita, aumentando o influxo de nutrientes pH-dependente para o citoplasma (Pereira, Alonso et al., 1999; Silber, Tonelli et al., 2002; Silber, Rojas et al., 2006; Magdaleno, Ahn et al., 2009).

Quando o Ac ou a LM foram adicionadas às culturas, observou-se que as diferenças encontradas para cada pH entre tratados e não tratados não foram estatisticamente significativas (critério de significância: $p < 0,05$). Em ambos os casos, não houve interação das drogas sobre a resistência do parasita em relação ao estresse de pH (**Figura 6**).

Figura 6- Efeito combinado do estresse de pH com acamprosato ou levomepromazina. As células ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL) foram incubadas em 200 μ L de meio LIT acondicionado a pH 7,5, 6,5, ou 5,5 por poço da placa de 96 poços, em octuplicatas. As culturas que foram suplementadas com as drogas foram acrescidas com 1,25 μ M de acamprosato(A) ou 200 μ M de levomepromazina(B). O crescimento das culturas foi acompanhado a cada 24 hs por leitura espectrofotométrica. Nos gráficos estão representados os dados do dia 5 após o início do crescimento (final da fase exponencial)

4.3 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e estresse térmico em epimastigotas

Como já descrito anteriormente, o *T. cruzi* passa por mudanças de temperatura durante seu ciclo de vida, uma vez que o inseto vetor não regula sua temperatura interna. Além disso, a própria alternância de hospedeiros para a sua manutenção submete aos parasitas a mudanças entre a temperatura do inseto e 37 °C. Por esse motivo, estudou-se o efeito das drogas simultaneamente com o estresse térmico. Para isso, submeteram-se as culturas às temperaturas a seguir: 37 °C (a temperatura do hospedeiro mamífero), 33 °C (a temperatura ótima para a evolução de infecção em

células mamíferas *in vitro*) e a 28 °C (temperatura ótima para as formas no inseto vetor).

Os dados obtidos mostraram um aumento surpreendente do crescimento dos epimastigotas a 33 °C em relação ao grupo controle em ambos os casos a baixo ilustrados (**Figura 7**). Interessantemente, esses dados são conflitantes com alguns dos relatados na literatura, divergência esta que pode se dever a especificidades da cepa que estamos utilizando para este estudo (Asin, Catala, 1995). É importante destacar que os dados obtidos dos parasitas cultivados a 37 °C tiveram um comportamento oscilatório da densidade celular não sendo possível uma única análise desses dados. Não houve efeito sinérgico das drogas em relação ao estresse térmico, uma vez que o efeito da inibição das drogas não fora maior que a soma dos efeitos independentes ($p < 0.05$).

Figura 7- Efeito combinado do estresse de temperatura com acamprosato e com levomepromazina.

As células ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL) foram incubadas em 200 μ L de meio LIT acondicionado a temperatura de 28,33 e 37 °C por poço da placa de 96 poços, em octuplicatas. As culturas que foram suplementadas com as drogas foram acrescidas com 1,25 μ M de acamprosato (A) ou 202,5 μ M de levomepromazina (B). O crescimento das culturas foi acompanhado a cada 24 hs por leitura espectrofotométrica. Nos gráficos estão representados os dados do dia 5 após o início do crescimento (final da fase exponencial)

4.4 Interação entre os tratamentos com Ac e LM e o estresse metabólico em epimastigotas

O estresse metabólico está principalmente relacionado com as condições às quais o parasita encontra-se submetido quando muda de ambiente ao longo do ciclo de vida. Exemplo disso são as mudanças na disponibilidade de nutrientes nas diferentes porções do tubo digestório do inseto vector, ou na transição do ambiente extracelular para o ambiente intracelular no hospedeiro mamífero. É bem estabelecido que as formas epimastigotas de *T.cruzi* metabolizam glicose, glutamato e aspartato com a finalidade de obter energia (Sylvester, Krassner, 1976). Sendo assim, têm se padronizado no laboratório um ensaio mediante o qual os parasitas são submetidos a estresse metabólico mediante a sua incubação em PBS, e avaliamos a sua capacidade de se recuperarem desse estresse após uma incubação em PBS suplementado com glicose, prolina, glutamato ou aspartato, a respeito do controle (PBS sem suplemento algum). Resolveu-se avaliar então, a possível interferência da LM na capacidade dos epimastigotas de *T. cruzi* de se recuperarem do estresse metabólico na presença desses metabólitos.

As culturas foram incubadas na presença de LM simultaneamente à condição de estresse metabólico. Observou-se uma redução significativa na capacidade dos parasitas de se recuperarem do estresse, independente do metabólito utilizado para esta finalidade (**Figura 8**). Quando avaliada a interação entre os tratamentos, observou-se interação sinérgica entre essas variáveis (estresse metabólico e LM) ($p < 0.05$).

Figura 8- Efeito combinado do estresse metabólico com levomepromazina. As células ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL) foram lavadas duas vezes e acondicionadas em PBS (controle), PBS+ 3mM glutamato, PBS+ 3mM L-prolina, PBS+ 3mM glicose na presença ou não de 202,5 μ M levomepromazina por 48 h, em octuplicatas. Após esse período, foi realizado o ensaio de viabilidade com MTT. No gráfico, está representada a viabilidade dos epimastigotas obtida a partir da leitura espectrofotométrica no filtro de onda de 595nm com referência em 690 nm

Interação entre os tratamentos com Ac e LM e o estresse oxidativo em epimastigotas **Condição de estresse oxidativo em epimastigotas**

Para investigar o efeito das drogas sobre o estresse oxidativo, os parasitas foram incubados primeiramente com diferentes doses de peróxido em distintas concentrações. Obteve-se um valor de IC_{50} de 0.1 mM, compatível com os dados relatados na literatura (Finzi, Chiavegatto et al., 2004; Magdaleno, Ahn et al., 2009). A possível interação entre os tratamentos submetidos simultaneamente sobre o parasita foi avaliada após a incubação das células por 90 min com 0.1 mM de H_2O_2 combinado ou não com as IC_{25} do LM (0,25 mM) ou de Ac (1,250 μ M). Os tratamentos combinados de LM ou Ac com H_2O_2 apresentaram efeitos estatisticamente significativos quanto a redução do crescimento parasitário no 5º dia pós incubação. A porcentagem de redução obtida para as células tratadas com LM foi de 45% e de 83% para as células tratadas com H_2O_2 . Para o tratamento combinado o valor obtido foi de 95,6% de inibição ($p < 0,05$). O efeito do Ac sobre as células tratadas consistiu numa diminuição da sua sobrevivência de 26,5%, enquanto que a diminuição da sua sobrevivência quando o tratamento foi combinado com o tratamento com H_2O_2 a diminuição da sobrevivência foi de 91,2% (**Figura 9**).

Figura 9- Efeito combinado do estresse oxidativo com acamprosato e com levomepromazina. As células ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL) foram lavadas duas vezes e resuspensas em PBS suplementado com: PBS (controle), PBS+ droga, PBS+ H_2O_2 [$100\mu M$] e PBS+ droga+ H_2O_2 [$100\mu M$]. Nessas condições as células foram incubadas por 90 min a $28^\circ C$. Após esse período, os parasitas foram lavados novamente com PBS e incubados em meio LIT. O crescimento dos parasitas foi acompanhado através da leitura espectrofotométrica da placa. Os dados correspondentes ao 5.º dia de iniciado o experimento foram analisados com ambas as drogas; acamprosato(A) e levomepromazina(B)

4.6 Avaliação da toxicidade de Ac e LM em culturas de células CHO-K₁

Para avaliar os possíveis efeitos das drogas em estudo nos estágios infectivos do parasita, é necessário quantificar a toxicidade das mesmas. A toxicidade celular do Ac e da LM foi avaliada mediante a incubação de células CHO-K₁ com os compostos propostos em distintas concentrações na faixa de 0 a 1.000 μM , para ambos os compostos. A viabilidade celular remanescente após tratamento foi avaliada mediante um ensaio de atividade mitocondrial (o ensaio de MTT). As doses letais para o 50 % das células quando tratadas com cada composto (DL_{50}) foram de 190 μM para Ac e de

0,860 mM para LM. É interessante destacar que em se tratando de compostos já aprovados para uso em seres humanos, as doses terapeuticamente estabelecidas são bem conhecidas. O Ac apresentou uma DL_{50} inferior ao valor descrito na literatura como sendo tóxica para células nervosas (1 mM) (Wu et al, 2001). Em contrapartida, o efeito da LM sobre a célula CHO- K_1 foi significativamente menor em comparação com os estudos do seu efeito tóxicos previamente concluídos.

Figura 10-Representação gráfica da viabilidade celular (CHO- K_1) após 48h de incubação na presença ou não de acamprosato e de levomepromazina. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 em placas de 24 poços durante 48h a 37 °C com concentrações entre 0 (controle) e 1000 μ M de acamprosato (A) e nas mesmas concentrações para levomepromazina(B). Após esse período foi realizado o teste de viabilidade com MTT, obtendo o gráfico da leitura espectofotométrica para cada droga

4.7 Avaliação da interferência dos compostos na infectividade do tripomastigota sobre as células hospedeiras

Finalmente, foi avaliado também o efeito do Ac e da LM sobre a infectividade das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os parasitas foram incubados na presença ou não de distintas concentrações das drogas. Após 2 hs de incubação, os parasitas foram incubados com as células CHO-K₁ durante 5 hs, as culturas foram lavadas para eliminar as formas tripomastigotas não internalizadas e incubadas com meio RPMI. Ao 5º dia pós-infecção, os tripomastigotas presentes nos sobrenadantes foram contados. Ambas as drogas mostraram ser capazes de interferir com a infectividade, sendo as correspondentes IC₅₀ de 70 µM para Ac (28 vezes maior que a encontrada para as formas epimastigotas) e 0,34 mM para LM (valor próximo ao obtido em epimastigotas) (Figura 11).

Figura 11-Representação gráfica de tripomastigotas contados no 5º.dia de infecção de CHO-K₁ na presença ou não de acamprosato e de levomepromazina. As células CHO-K₁ foram infectadas com tripomastigotas incubados previamente por 2h em distintas concentrações de drogas, e então, foram lavadas após 5h de contato com os parasitas mantidas em meio RPMI 1640 a 37°C. 24h passadas, a placa foi mantida a 33°C e o meio foi renovado diariamente. No 5º.dia pós infecção, os tripomastigotas sobrenadantes de cada concentração de acamprosato (A) e de LM (B) foram contados em câmara de Neubauer

5 DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, a quimioterapia contra o *T. cruzi* está baseada em duas drogas descobertas e aprovadas para uso em humanos aproximadamente quatro décadas atrás: o nifurtimox e o benznidazol. Por motivos já explicados, ambas as drogas resultam insatisfatórias, e é de primeira necessidade a busca de novas alternativas terapêuticas para resolver este problema sanitário. Nas últimas décadas, à medida que foi se compreendendo melhor a biologia e o metabolismo do parasita, uma quantidade de possíveis alvos foram motivo de intensas pesquisas e estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Duschak, Couto, 2007). A continuação apresenta-se um resumo dos que vem resultando mais promissores.

Cisteína proteinases

É bem conhecida a participação das cisteínas proteinases em diferentes processos celulares tais como o metabolismo energético, a diferenciação, a invasão das células hospedeiras e diferentes mecanismos de evasão da resposta imunológica (Cazzulo, 2002; Scharfstein, 2006). O membro majoritário da família das cisteína proteinases em *T. cruzi* é a cruzipaina (Cazzulo, Cazzulo Franke et al., 1990; Murta, Persechini et al., 1990; Eakin, Mills et al., 1992), enzima que apresenta várias isoformas com diferentes localizações subcelulares (Jose Cazzulo, Stoka et al., 2001). Vários estudos têm validado essa enzima como alvo para drogas (Cazzulo, 2002). Especificamente, o uso de inibidores sintéticos tais como os dipeptídeos vinil-sulfon derivados mostraram resultados promissores *in vivo* (Engel, Doyle, Hsieh et al., 1998; Engel, Doyle, Palmer et al., 1998; Roush, Cheng et al., 2001; Barr, Warner et al., 2005).

Via da biosíntese de esteróis

As membranas do *T. cruzi* possuem ergosterol em lugar de colesterol. Sobre a base dessa diferença (a existência de enzimas específicas para a síntese de ergosterol) têm se proposto inibidores específicos para essa via metabólica que apresentariam baixa toxicidade no hospedeiro mamífero (Urbina, 1999). Alguns azole- derivados contra enzimas dessa via (esterol C₁₄ α -demetilases, óxido esqualeno ciclase e 2-D esqualeno sintase) foram avaliados tanto *in vivo* quanto *in vitro* com resultados promissores

(Urbina, Payares et al., 1996; Urbina, Payares et al., 1998; Urbina, Lira et al., 2000; Buckner, Griffin et al., 2001; Elhalem, Bailey et al., 2002; Urbina, Concepcion et al., 2003; Urbina e Docampo, 2003a; Urbina, Payares et al., 2003; Oliaro-Bosso, Ceruti et al., 2005).

Biosíntese de poli-isoprenoides

As enzimas que participam da biosíntese dos poli-isoprenoides tais como a farnesilfosfato sintase (Montalvetti, Bailey et al., 2001; Szajnman, Montalvetti et al., 2003; Szajnman, Ravaschino et al., 2005) e a protein-farnesil transferase (Esteve, Kettler et al., 2005) também mostraram ser alvos interessantes de vários inibidores. Dentre esses inibidores, destacam-se os bifosfonatos, inibidores da farnesilpirofosfato sintase (Montalvetti, Bailey et al., 2001). Além disso, os bifosfonatos se acumulam nos ácidocalcissomos, sugerindo que essas organelas também são alvos dessas drogas (Docampo, Moreno, 2001). Dentre os inibidores de protein-farnesil transferases, a R-fenilalanina e os N-propilpepirazinil derivados mostraram resultados promissores *in vivo* e *in vitro*. (Esteve, Kettler et al., 2005)

Salvatagem das purinas e síntese de nucleotídeos

As enzimas de essas vias metabólicas são essenciais para os trypanossomatídeos porque esses parasitas são auxotróficos para purinas, sendo, portanto dependentes do seu salvatagem e da sua importação desde o médio externo (Landfear, Ullman et al., 2004; Landfear, 2008). As proteínas dessas vias metabólicas que têm sido avaliadas como alvos são a hipoxantina/guanina-fosforibosil transferase (Avila, Avila, 1981; Avila, Avila et al., 1981; Nakajima-Shimada, Hirota et al., 1996), a di-idrofolato redutase, a pteridina redutase (Khabnadideh, Pez et al., 2005; Senkovich, Bhatia et al., 2005) e a diidro-orotato desidrogenase (Nara, Kamei et al., 2005). O allopurinol, inibidor da hipoxantina/guanina-fosforibosil transferase foi proposto para uso em humanos para tratar as reativações da infecção pelo *T. cruzi* após transplante. (Almeida, Carvalho et al., 1996; Bestetti, Theodoropoulos, 2009)

Topoisomerases e DNA

Algumas enzimas e proteínas relacionadas com a replicação do DNA têm sido alvos de inibição seletiva (Bodley, Shapiro, 1995). Particularmente foram testadas as enzimas envolvidas na replicação do kDNA, como as topoisomerases I e II mitocondriais, devido a suas peculiaridades estruturais não existentes nos hospedeiros (Rowland, Moore-Lai et al., 2003; Stephens, Brun et al., 2003; Stolić, Miškovic et al., 2009).

Enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo

As peculiaridades do metabolismo redox de *T. cruzi* também vem fornecendo alvos de interesse para atividades tripanocidas específicas. O fato do metabolismo redox nesses parasitas estar fundamentalmente baseado na síntese de tripanotiona (composto presente exclusivamente em kinetoplastídeos) em lugar de glutathione (composto de função análoga presente nos demais organismos eucariotas) faz com que as enzimas que catalizam a sua biossíntese sejam candidatos naturais a alvos para drogas. Uma variedade de compostos tais como derivados de naftoquinonas, complexos organometálicos, compostos tricíclicos e derivados de poliaminas tem sido avaliados contra a tripanotiona redutase com resultados promissores (Farrell, Williamson et al., 1984; Bonse, Richards et al., 2000; Rivarola, Paglini-Oliva, 2002; Cuellar, Salas et al., 2003; Parveen, Khan et al., 2005; Rivarola, Bustamante et al., 2005; Aguirre, Boiani et al., 2006; Silva, Costa et al., 2006).

Metabolismo de aminoácidos

Recentemente nosso grupo e outros vêm propondo vias específicas do metabolismo de aminoácidos como alvos para drogas tripanocidas (Silber, Colli et al., 2005b; Paes, Galvez Rojas et al., 2008). A inibição da arginina quinase de *T. cruzi*, uma enzima ausente no hospedeiro mamífero, mostrou ter efeitos tripanocidas em epimastigotas, enquanto que a inibição da prolina racemase de *T. cruzi*, enzima também ausente no hospedeiro mamífero, mostrou uma potente atividade tripanocida *in vivo* e *in vitro* (Coutinho, Ferreira et al., 2009). No nosso laboratório foi avaliado um análogo de prolina como inibidor do transporte desse metabólito para o interior da

célula(Magdaleno, Ahn et al., 2009). A inibição do transporte de prolina têm mostrado resultados interessantes *in vitro*.

Apesar da quantidade de resultados promissores sumarizados acima, até agora não têm aparecido novas drogas com perspectivas de substituir as drogas clássicas em uso em humanos (benznidazol e nifurtimox). Desse fato torna-se evidente que devem ser incrementados os esforços para avaliar novas propostas de estratégias terapêuticas. Como mencionado na introdução, pesquisas prévias do nosso laboratório apontam para a ocorrência de GABA em *T. cruzi*, assim como para o seu metabolismo e o metabolismo de glutamato. Foi relatado o fato de que a presença desse aminoácido é capaz de aumentar em até três vezes a capacidade dos epimastigotas de internalizar glutamato. Também foi evidenciada a ocorrência de GABA no citoplasma dessas células, o que, junto com as evidências da existência de um sistema ativo de transporte para esse aminoácido, apontam para o fato de GABA ser metabolizado pelo *T. cruzi*. Dados prévios da literatura também apontam para a existência em *T. cruzi* de um possível receptor de GABA tipo NMDA envolvido na movimentação flagelar (Pereira, Paveto et al., 1997). Esses fatos em conjunto, nos levaram a propor uma avaliação sistemática de drogas de uso psiquiátrico que tivessem como alvos receptores de GABA, com o propósito de utilizar estratégias do tipo *piggy back*: pesquisar possíveis prescrições como tripanocidas de drogas já em uso para outras doenças. Por outro lado, resolveu-se também avaliar drogas de uso psiquiátrico em humanos, que tivessem sido abordadas previamente como inibidores de enzimas que ocorrem exclusivamente em tripanossomatídeos. Com esse intuito resolveu-se avaliar a atividade tripanocida dos dois compostos aqui apresentados, que já são usados em humanos: LM, antipsicótico previamente relatado como inibidor da tripanotiona reductase, e Ac, um agonista de GABA utilizado para tratar a dependência alcoólica.

Levomepromazina

As fenotiazinas são compostos pertencentes a uma grande família de moléculas que apresentam perspectivas crescentes para o tratamento de neuropatologias, câncer, desordens imunológicas e doenças infecciosas (Sudeshna, Parimal, 2010; Ohlow, Moosmann, 2011). As atividades biológicas identificadas até agora para membros apresentando diferentes substituições químicas em diferentes posições da molécula, principalmente 2 e 10 foram de particular interesse. Por exemplo, derivados tendo um

substituinte tio-metil na posição 10 e um fluoreto na posição 2 (triflupromazina) mostraram atividades antimicrobianas (Sudeshna, Primal, 2010). Esse mesmo composto, assim como a clorpromazina, mostrou-se ativo contra *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba culbertsoni* e *A. polyphaga* (Schuster, Mandel, 1984). Apesar de serem desconhecidos os mecanismos de ação, foi proposto que, no caso das atividades amebicidas, as drogas poderiam estar agindo via um efeito antagonista sobre as calmodulinas (Makioka, Kumagai et al., 2002). No caso específico da clorpromazina, uma variante lipofílica, foi proposto que esta agiria via desestabilização da membrana plasmática nesses organismos. Interessantemente, a clorpromazina mostrou atividade inibitória do crescimento em promastigotas de *Leishmania donovani* (Pearson, Manian et al., 1982), além de outros organismos como *Candida albicans* (Wood, Nugent, 1985), *Staphylococcus aureus* (Ordway, Viveiros et al., 2002), *Mycobacterium avium* (Crowle, Ross et al., 1992) e *M. tuberculosis* (Ratnakar, Murthy, 1993).

Outra fenotiazina que demonstrou interessantes propriedades microbicidas foi a trifluoperazina, sendo inibidora do crescimento de *Shigella spp.*, *Vibrio cholera* e *V. parahaemolyticus*. Nesse contexto, a LM mostrou uma capacidade inibitória para o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentando um IC₅₀ de 0,41 mM, dentro da faixa das doses inibitórias mostradas por outras fenotiazinas quando utilizadas para outros organismos (aproximadamente entre 0,05 e 0,50 mM).

Como já mencionado, o *T. cruzi*, circula ao longo do seu ciclo de vida por diferentes ambientes (diferentes regiões do tubo digestivo no inseto vetor, ou o médio intra e extracelular no hospedeiro mamífero). Devido a este fato, está permanentemente exposto a diversas condições de estresse ao longo do seu ciclo biológico (Silber, 2005). Dentre esses estresses naturais, os estresses oxidativo, nutricional, térmico e de pH são relevantes, e vários mecanismos relacionados com a capacidade do parasita de resistir a mudanças nesses parâmetros (Lisvane Silva, Mantilla et al, 2011). Nesse sentido, a interferência da LM com esses mecanismos, poderia ser relevante, sendo de interesse para este trabalho possível ocorrência de uma interação sinérgica entre o tratamento com LM e esses parâmetros. Como mostraram nossos resultados, não houve evidências de interações entre o tratamento com LM e os estresses oxidativo, térmico e de pH. Porém, LM interferiu com capacidade dos parasitas de se recuperarem do estresse nutricional quando prolina, glutamato, aspartato ou glicose foram utilizados como suporte energético para esse processo de recuperação.

O jejum causador de estresse nutricional acontece naturalmente ao longo do ciclo de vida do parasita, dentre outros quando o parasita transita entre o intestino médio e o posterior no hospedeiro invertebrado (Contreras et al, 1985). Na porção terminal do tubo digestivo, alguns nutrientes estão novamente presentes devido a um refluxo natural desde a hemolinfa para o tubo digestivo via os túbulos de Malpighi. Os mais relevantes desses nutrientes são precisamente prolina, glutamato e aspartato (Contreras et al, 1985), os quais demonstraram ser capazes de recuperar os níveis de ATP intracelular do parasita necessários para a metaciclogênese (Cazzulo, 1992). Como nossos resultados mostraram que a LM interferiu com a recuperação do estresse nutricional devida a esses nutrientes, foi levantada a hipótese de que a LM também poderia estar interferindo com a metaciclogênese. Um dos modelos clássicos de metaciclogênese foi descrito por Contreras e colaboradores, e baseia-se na incubação dos parasitas em um meio salino por triatomine artificial urine (TAU) suplementado com glicose, prolina, glutamato e aspartato como fontes de energia (Contreras et al., 1985). Os nossos resultados confirmaram a hipótese levantada, mostrando que a LM foi capaz de inibir a metaciclogênese.

Finalmente foi avaliado o efeito da LM sobre a eclosão de formas tripomastigotas de células infectadas. Interessantemente, o tratamento das células infectadas com uma dose de 0,5 mM resultou em uma inibição da eclosão do parasita de mais de 90%. Interessantemente, em trabalhos prévios, tinha sido avaliada outra fenotiazina, a tioridazina (uma droga neuroléptica). A tioridazina mostrou um valor de IC_{50} em epimastigotas de 5 μ M. porém, as culturas infectadas mostraram ser 10 vezes menos sensíveis ao tratamento da droga (Paglini-Oliva, Fernandez et al., 1998). Mais interessante ainda é o fato de que embora o tratamento de camundongos infectados com tioridazina diminuiu significativamente a parasitemia, porém não diminuiu o dano cardíaco, mesmo em camundongos nos quais não se evidenciou a presença de ninhos de amastigotas (Lo Presti et al, 2004; Rivarola et al., 1999).

Os dados apresentados sustentam a ideia de que o tratamento com LM interfere no desenvolvimento do parasita em passos metabólicos que envolvem a oxidação de glicose, prolina, glutamato e aspartato, não excluindo enzimas de outras vias como a tripanotiona redutase (como já sugerido para outras fenotiazinas quando testadas em *Leishmania* spp. ou *T. cruzi*).

Acamprosato

Quimicamente denominado de *bis*-acetil homotaurinato de cálcio ou *bis*-acetil aminopropano-sulfonato de cálcio, o acamprosato é comercializado como Campral®, como adjuvante no tratamento de dependência alcoólica. Sua estrutura molecular é similar a certos aminoácidos farmacologicamente ativos como GABA, taurina e glutamato. (Littleton, 1995)

Inspirado nas características dos sistemas de transporte e no receptor de GABA e glutamato no SNC, é que surgiu o interesse em estudar o Acamprosato em *Trypanosoma cruzi*. Esta droga inibe a atividade excitatória glutamatérgica agindo provavelmente em uma subclasse de receptores do glutamato denominados receptores tipo NMDA. O NMDA é considerado um co-agonista parcial desses receptores (Dahchour et al., 1998). As atividades do acamprosato são compatíveis com a hipótese de que essa medicação suprime a hiperatividade associadas com altos níveis de excitação do glutamato durante a retirada do álcool em pacientes dependentes. Portanto essa medicação reduz a toxicidade induzida pelo glutamato (Zeise, Kasparov et al., 1993).

Em *Paramecium primaurelia* a presença do receptor de GABA (GABA_A) foi demonstrada bem como sua capacidade de sintetizar e liberar o neurotransmissor GABA para o ambiente (Ramonio, 2005). Também foi demonstrada a importância de GABA na indução de diferenciação terminal do ciclo de vida do *Dictyostelium discoideum*, através de um receptor de GABA (Anjard, Loomis, 2006). Em bactérias, parece que a função de GABA *shunt* está relacionada à resistência a baixo pH. Quando *Escherichia coli* é exposta a estresse de pH, a atividade de GAD é induzida, então os prótons são removidos por decarboxilação de glutamato. O GABA produzido é então exportado pelas células (Castanie-Cornet, Penfound et al., 1999). Em plantas, GAD é ativado pela acidificação do pH que gera um acúmulo de GABA, como forma de regular a acidificação de pH (Snedden, Arazi et al., 1995). Em helmintos, bem como nos nematóides *Ascaris suum* e *Caenorhabditis elegans* (Mcintire, Jorgensen et al., 1993) GABA poderia agir como um inibidor de transmissor interneural e neuromuscular.

Ainda não se tem caracterizado a via GABA no ciclo de vida do *T. cruzi*. Portanto, é necessário aprofundar o conhecimento dos mecanismos bioquímicos e

moleculares dos prováveis transportadores e receptores de GABA com seus diferentes inibidores e bloqueadores do sistema nervoso central. Sendo assim, a avaliação dos efeitos do Ac sobre as formas majoritárias do *T.cruzi*, faz-se importante na questão de procura e desenvolvimento de novos e mais eficazes terapias na doença de Chagas. Os resultados obtidos foram promissores quanto a inibição de crescimento parasitário na forma epimastigota, mostrando um IC₅₀ significativamente baixo em relação ao descrito em literatura, 2,50 µM (p<0,05).

Também houve uma inibição considerável da infectividade das formas tripomastigotas sobre as células CHO-K₁, onde obteve-se uma IC₅₀ 70 µM. Não houve sinergismo do psicofármaco em interação às condições de estresses, uma vez que a diferença entre as variáveis não se mostraram estatisticamente significativas (p<0,05). Mesmo o valor de DL₅₀ obtido para a linhagem de CHO- K₁ seja maior que o relatado em estudos anteriores, em geral, pode-se afirmar que o acamprosato é bem tolerado, uma vez que em todos os estudos clínicos realizados as reações adversas mais comuns detectadas são as mesmas quando se há elevado nível sérico de cálcio (poliúria, nefrolitíase, anorexia, constipação intestinal, taquicardia, náuseas vômitos). Além disso, a droga não apresenta sinais de atividade mutagênica nem carcinogênica.

De maneira geral, as drogas cuja atividade tripanocida foram abordadas neste estudo mostraram perspectivas interessantes. Embora as atividades tripanocidas foram moderadas, essas drogas podem servir como compostos líderes para um posterior desenho de derivados com atividades tripanocidas otimizadas.

6 CONCLUSÕES

De maneira geral os resultados obtidos neste trabalho demonstram que:

1. Tanto o acamprosato quanto a levomepromazina mostraram efeito inibidor no crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando uma relação dose-dependente, com CI_{50} de 2,50 μ M e 405 μ M, respectivamente.
2. O fato de a levomepromazina inibir o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* pode indicar a presença de pelo menos um alvo específico. Trabalhos realizados com promastigotas de *Leishmania spp.* apontam para a inibição da tripanotiona reductase (Venkatesan, Shukla et al.)
3. O fato do acamprosato, molécula biomimética de GABA inibir significativamente o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* sustenta a hipótese da presença de pelo menos um alvo relacionado ao metabolismo deste aminoácido.
4. O efeito da combinação de estresses provocadas nas formas epimastigotas com as drogas não foi maior que a soma dos efeitos dos eventos separadamente, concluindo-se que não houve interação do acamprosato e da levomepromazina com essas condições de estresse. Porém, LM interferiu com capacidade dos parasitas de se recuperarem do estresse nutricional quando prolina, glutamato, aspartato ou glicose foram utilizados como fonte de energia.
5. A toxicidade de acamprosato para as células CHO-K₁ foi significativamente menor que a encontrada na literatura para neurônios *in vitro* ($CI_{50} \geq 1$ mM para neurônios) (Wu et al, 2001).
6. Ambas as drogas testadas em distintas concentrações em tripomastigotas reduziram a densidade dos parasitas resultantes da infecção de culturas de CHO-K₁. Esses fatos podem indicar uma atividade inibitória do ciclo infectivo de *T. cruzi* em células hospedeiras, tanto no período pré-invasivo do parasita (redução da viabilidade celular, motilidade do flagelo ou adesão celular) como no pós-invasivo (evasão do vacúolo parasitóforo, diferenciação, multiplicação celular, lise da célula hospedeira). Os valores de CI_{50} foram menores que as concentrações tóxicas obtidas para CHO-K₁, sendo 70 μ M para acamprosato e 336 μ M para levomepromazina.

REFERÊNCIAS

- Aguirre, G., M. Boiani, et al. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *Eur J Med Chem.*2006; 41(4): 457-66.
- Almeida-De-Faria, M., E. Freymuller, et al. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol.*1999; 92(4): 263-74.
- Almeida, D. R., A. C. Carvalho, et al. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant.*1996;15(10): 988-92.
- Asin, S., S. Catala. Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: influence of temperature and blood consumption. *J Parasitol.*1995; 81(1):1-7.
- Avila, J. L., A. Avila. *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Exp Parasitol.*1981; 51(2):204-8.
- Avila, J. L., A. Avila, et al. Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.*1981; 30(4):769-74.
- Barr, S. C., K. L. Warner, et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.*2005; 49(12):5160-1.
- Barrett, M. P., R. J. Burchmore, et al. The trypanosomiasis. *Lancet.*2003; 362(9394):1469-80.
- Bestetti, R. B., T. A. Theodoropoulos. A systematic review of studies on heart transplantation for patients with end-stage Chagas' heart disease. *J Card Fail.*2009; 15(3):249-55.
- Bittencourt, A. L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*1992; 34(5): 403-8.
- Bodley, A. L., T. A. Shapiro. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. *Proc Natl Acad Sci.*1995; 92(9):3726-30.
- Bonse, S., J. M. Richards, et al. (2,2':6',2''-Terpyridine) platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. *J Med Chem.*2000; 43(25):4812-21.
- Boscardin, S. B., A. C. Torrecilhas, et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med.*2010; 14(6):1373-84.
- Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.*1973; 27:347-82.

- Brener, Z., E. Chiari. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. 1963; 19:220-4.
- Buckner, F. S., J. H. Griffin, et al. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother.2001; 45(4):210-5.
- Camargo, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop.1964;12:93-100.
- Canepa, G. E., A. M. Silber, et al. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett.2004; 236(1):79-84.
- Cannata, J. J., J. J. Cazzulo. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol.1984; 11:37-49.
- Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, et al. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. J Bacteriol.1999; 181(11): 3525-35.
- Cazzulo, J. J. Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B.1984; 79(3):9-20.
- Cazzulo, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. FASEB J.1992; 6(13):3153-61.
- Cazzulo, J. J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr.1994; 26(2):157-65.
- Cazzulo, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. Curr. Top. Med. Chem.2002; 2(11):1261-71.
- Cazzulo, J. J., M. C. Cazzulo Franke, et al. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. Biochim Biophys Act.1990; 1037(2): 186-91.
- Cazzulo, J. J., B. M. De Cazzulo, et al. NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B.1979; 64(1):129-31.
- Cazzulo, J. J., B. M. Franke De Cazzulo, et al. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol.1985; 16(3): 329-43.
- Chamond, N., M. Goytia, et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. Mol Microbiol.2005;58(1):46-60.
- Chamond, N., C. Gregoire, et al. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. J Biol Chem.2003; 278(18):15484-94.
- Contreras, V. T., J. M. Salles, et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol.1985;16(3):315-27.

- Coustou, V., M. Biran, et al. Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. 2008; 283(24):16342-54.
- Coutinho, L., M. A. Ferreira, et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(8):1055-62.
- Crowle, A. J., E. R. Ross, et al. Comparison of the abilities of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium* intracellular to infect and multiply in cultured human macrophages from normal and human immunodeficiency virus-infected subjects. Infect Immun. 1992; 60(9):3697-703.
- Cuellar, M. A., C. Salas, et al. Synthesis and in vitro trypanocide activity of several polycyclic drimane-quinone derivatives. Bioorg Med Chem. 2003; 11(12):2489-97.
- Dahchour, A., P. De Witte, et al. Central effects of acamprosate: part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. Psychiatry Res. 1998; 82(2):107-14.
- Danbolt, N. C. Glutamate uptake. Prog Neurobiol. 2001; 65(1):1-105.
- Daoust, M., C. Saligaut, et al. GABA transmission, but not benzodiazepine receptor stimulation, modulates ethanol intake by rats. Alcohol. 1987; 4(6):469-72.
- De Souza, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int Rev Cytol. 1984; 86:197-283.
- Dias, J. C. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (Suppl 1): 41-5.
- Docampo, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des. 2001; 7(12):1157-64.
- Docampo, R. e S. N. Moreno. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. Curr Drug Targets Infect Disord. 2001; 1(1): 51-61.
- Duschak, V. G. e J. J. Cazzulo. Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 1991; 67(2): 131-5.
- Duschak, V. G. e A. S. Couto. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2007; 2(1):19-51.
- Eakin, A. E., A. A. Mills, et al. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 1992; 267(11): 7411-20.
- Elhalem, E., B. N. Bailey, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of aryloxyethyl thiocyanate derivatives against *Trypanosoma cruzi*. J Med Chem. 2002; 45(18): 3984-99.

- Enell, L., Y. Hamasaka, et al. gamma-Aminobutyric acid (GABA) signaling components in *Drosophila*: immunocytochemical localization of GABA_(B) receptors in relation to the GABA_(A) receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *J Comp Neurol*.2007; 505(1):18-31.
- Engel, J. C., P. S. Doyle, et al. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*.1998; 188(4):725-34.
- Engel, J. C., P. S. Doyle, et al. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*.1998; 111(5): 597-606.
- Esteva, M. I., K. Kettler, et al. Benzophenone-based farnesyltransferase inhibitors with high activity against *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem*.2005; 48(23): 7186-91.
- Fadda, F. e Z. L. Rossetti. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*.1998; 56(4): 385-431.
- Faingold, C. L., P. N'gouemo, et al. Ethanol and neurotransmitter interactions-from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol*.1998; 55(5):509-35.
- Farrell, N. P., J. Williamson, et al. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. *Biochem Pharmacol*.1984; 33(7): 961-71.
- Finzi, J. K., C. W. Chiavegatto, et al. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol*.2004;133(1):37-43.
- Gajcy, K., S. Lochynski, et al. A role of GABA analogues in the treatment of neurological diseases. *Curr Med Chem*.2010;17(22):2338-47.
- Guerri, C. e S. Grisolia. Chronic ethanol treatment affects synaptosomal membrane-bound enzymes. *Pharmacol Biochem Behav*.1983; 18 (Suppl 1): 45-50.
- Gutierrez-Correa, J., A. H. Fairlamb, et al. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. *Free Radic Res*. 2001; 34(4):363-78.
- Hampton, J. R. Lysine uptake in cultured *Trypanosoma cruzi*: interactions of competitive inhibitors. *J Protozool*.1970; 17(4):597-600.
- Hampton, J. R. Arginine transport in the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*. 1971; 18(4):701-3.
- Hassel, B., C. U. Johannessen, et al. Quantification of the GABA shunt and the importance of the GABA *shunt* versus the 2-oxoglutarate dehydrogenase pathway in GABAergic neurons. *J Neurochem*.1998; 71(4): 1511-8.
- Hoare, C. A. The classification of mammalian trypanosomes. *Ergeb Mikrobiol Immunitätsforsch Exp Ther*.1966; 39:43-57.

- Homsy, J. J., B. Granger, et al. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool.1989; 36(2):150-3.
- Iribarne, F., M. Paulino, et al. Assaying phenothiazine derivatives as trypanothione reductase and glutathione reductase inhibitors by theoretical docking and molecular dynamics studies. J Mol Graph Model.2009; 28(4):371-81.
- Jose Cazzulo, J., V. Stoka, et al. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des.2001; 7(12):1143-56.
- Khabnadideh, S., D. Pez, et al. Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. Bioorg Med Chem.2005; 13(7):2637-49.
- Kollien, A. H. e G. A. Schaub. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. Am J Trop Med Hyg.1998; 59(1):166-70.
- Krassner, S. M. e B. Flory. Proline metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. J Protozool.1972; 19(4):682-5.
- Lamour, N., L. Riviere, et al. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. J Biol Chem.2005; 280(12):1902-10.
- Landfear, S. M. Drugs and transporters in kinetoplastid protozoa. Adv Exp Med Biol. 2008; 625: 22-32.
- Landfear, S. M., B. Ullman, et al. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. Eukaryot. Cell.2004; 3(2):245-54.
- Lisvane Silva, P., B. S. Mantilla, et al. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. Curr Pharm Des.2011; 17(20): 2074-99.
- Magdaleno, A., I. Y. Ahn, et al. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. PLoS One.2009;4(2):4534.
- Makioka, A., M. Kumagai, et al. Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol Res.2002;88(9):837-43.
- Mcintire, S. L., E. Jorgensen, et al. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. Nature.1993; 364(6435): 337-41.
- Moncayo, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz.1999; 94 (Suppl 1): 401-4.
- Montalvetti, A., B. N. Bailey, et al. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. J Biol Chem.2001; 276(36):33930-7.

- Murta, A. C., P. M. Persechini, et al. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol.*1990; 43(1):27-38.
- Nakajima-Shimada, J., Y. Hirota, et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(11):2455-8.
- Nalpas, B., H. Dabadie, et al. Acamprosate. From pharmacology to therapeutics. *Encephale.*1990;16(3):175-9.
- Nara, T., Y. Kamei, et al. Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. *Parasitol Int.*2005;54(1):59-64.
- Obungu, V. H., J. K. Kiara, et al. Catabolism of proline by procyclic culture forms of *Trypanosoma congolense*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*1999; 123(1):59-65.
- Ohlow, M. J. e B. Moosmann. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discov Today.*2011;16(3-4):119-31.
- Oliaro-Bosso, S., M. Ceruti, et al. Analogs of squalene and oxidosqualene inhibit oxidosqualene cyclase of *Trypanosoma cruzi* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids.* 2005; 40(12):1257-62.
- Ordway, D., M. Viveiros, et al. Intracellular activity of clinical concentrations of phenothiazines including thioridazine against phagocytosed *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.*2002;20(1):34-43.
- Paes, L. S., R. L. Galvez Rojas, et al. Active transport of glutamate in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Eukaryot Microbiol.*2008;55(5):382-7.
- Paglini-Oliva, P., A. R. Fernandez, et al. Structural, ultrastructural studies and evolution of *Trypanosoma cruzi*-infected mice treated with thioridazine. *Exp Mol Pathol.*1998;65(2):78-86.
- Parveen, S., M. O. Khan, et al. Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor, and of N-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide. *J Med Chem.*2005;48(25):8087-97.
- Pearson, R. D., A. A. Manian, et al. Lethal effect of phenothiazine neuroleptics on the pathogenic protozoan *Leishmania donovani*. *Science.*1982;217 (4557):369-71.
- Peluffo, G., L. Piacenza, et al. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol.* 2004; 20(8):363-9.
- Pereira, C., C. Paveto, et al. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. *J. Eukaryot. Microbiol.*1997; 44(2):155-6.

- Pereira, C. A., G. D. Alonso, et al. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS Lett.* 2002; 526 (1-3): 111-4.
- Pereira, C. A., G. D. Alonso, et al. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Lett.* 2003; 554 (1-2): 201-5.
- Pereira, C. A., Alonso G. D., Flawiá M.M., Torres H.N. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol.* 2002; 49(1): 82-5.
- Pinto Dias, J. C. Chagas cardiomyopathy: a myth and a challenge. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1990; 60(2):119-20.
- Prata, A. Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am.*1994;8(1):61-76.
- Ramoino, P., C. Usai, et al. GABA_B receptor intracellular trafficking after internalization in *Paramecium*. *Microsc Res Tech.* 2005; 68 (5): 290-5.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. Chagas disease. *Lancet.*2010; 375 (9723):1388-402.
- Ratnakar, P. e P. S. Murthy. Trifluoperazine inhibits the incorporation of labelled precursors into lipids, proteins and DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEMS Microbiol Lett.*1993; 110(3): 291-4.
- Ribeiro, R. D., T. A. Rissato, Garcia, et al. Mechanisms of transmission of the etiological agent of Chagas' disease. *Rev Saude Publica.*1987; 21(1):51-4.
- Rivarola, H. W., J. M. Bustamante, et al. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. *Exp Parasitol.*2005; 111(2):80-6.
- Rivarola, H. W., A. R. Fernandez, et al. Thioridazine treatment modifies the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol.*1999; 93(7):695-702.
- Rivarola, H. W. e P. A. Paglini-Oliva. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.*2002; 2(1):3-52.
- Rohloff, P., C. O. Rodrigues, et al. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;126(2):219-30.
- Roush, W. R., J. Cheng, et al. Potent second generation vinyl sulfonamide inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Bioorg Med Chem Lett.*2001;11(20):2759-62.
- Rowland, E. C., D. Moore-Lai, et al. Inhibition of in vitro intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* by dicationic compounds. *J Parasitol.*2003;89(5):1078-80.

- Sakimura, K., T. Kutsuwada, et al. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*.1995; 373(6510):151-5.
- Scharfstein, J. Parasite cysteine proteinase interactions with alpha 2-macroglobulin or kininogens: differential pathways modulating inflammation and innate immunity in infection by pathogenic trypanosomatids. *Immunobiology*.2006; 211(1-2):117-25.
- Schmunis, G. A. Risk of Chagas' disease through transfusions in the Americans. *Medicina*.1999;59 (Supl 2): 25-34.
- Schuster, F. L. e N. Mandel. Phenothiazine compounds inhibit in vitro growth of pathogenic free-living amoebae. *Antimicrob Agents Chemother*.1984; 25(1):109-12.
- Senkovich, O., V. Bhatia, et al. Lipophilic antifolate trimetrexate is a potent inhibitor of *Trypanosoma cruzi*: prospect for chemotherapy of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*.2005; 49(8): 3234-8.
- Silber, A. M., W. Colli, et al. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005a;5(1):53-64.
- Silber, A. M. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord*.2005b;5(1):53-64.
- Silber, A. M., I. S. Marcipar, et al. *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. *Exp Parasitol*.2002; 100(4):217-25.
- Silber, A. M., R. L. Rojas, et al. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*.2006; 36(2):157-63.
- Silber, A. M., R. R. Tonelli, et al. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*.2002;49(6):441-6.
- Silva, R. S., E. M. Costa, et al. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*.2006;41(4):526-30.
- Slinker, B. K. The statistics of synergism. *J Mol Cell Cardiol*.1998;30(4):723-31.
- Snedden, W. A., T. Arazi, et al. Calcium/Calmodulin Activation of Soybean Glutamate Decarboxylase. *Plant Physiol*.1995;108(2):543-549.
- Stephens, C. E., R. Brun, et al. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *Bioorg Med Chem Lett*.2003;13(12):2065-9.
- Stolić, I., K. Mišković, et al. Effect of 3,4-ethylenedioxy-extension of thiophene core on the DNA/RNA binding properties and biological activity of bisbenzimidazole amidines. *Bioorg Med Chem*.2009;17(6):2544-54.

- Sudeshna, G. e K. Parimal. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Eur J Pharmacol.*2010; 648(1-3):6-14.
- Sylvester, D. e S. M. Krassner. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B.*1976;55(3):443-7.
- Szajnman, S. H., A. Montalvetti, et al. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg Med Chem Lett.*2003; 13(19):3231-5.
- Szajnman, S. H., E. L. Ravaschino, et al. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg Med Chem Lett.*2005; 15(21):4685-90.
- Ter Kuile, B. H. e F. R. Opperdoes. Comparative physiology of two protozoan parasites, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*, grown in chemostats. *J Bacteriol.*1992; 174(9):2929-34.
- Tetaud, E., F. Bringaud, et al. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*.*Proc Natl Acad Sci.*1994; 91(17):8278-82.
- Tonelli, R. R., A. M. Silber, et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.*2004a; 6(8): 733-41.
- Tonelli, R. R., A. M. Silber, et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.*2004b; 6(8): 733-41.
- Tyler, K. M. e D. M. Engman. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.*2001; 31(5-6): 472-81.
- Urbina, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J Mol Med.*1999; 77(3): 332-8.
- Urbina, J. A., J. L. Concepcion, et al. Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother.*2003; 47(6): 2047-50.
- Urbina, J. A. e R. Docampo. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*2003a; 19(11): 495-501.
- Urbina, J. A.. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*2003b; 19(11):495-501.
- Urbina, J. A., R. Lira, et al. 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; 44(9): 2498-502.

Urbina, J. A., G. Payares, 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; 42(7):1771-7.

Urbina, J. A. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science.*1996; 273(5277): 969-71.

Urbina, J. A. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.*2003; 21(1):27-38.

Venkatesan, S. K., A. K. Shukla, et al. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. *J Comput Chem*,31(13):2463-75.

Vercesi, A. E., C. F. Bernardes, et al. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi in situ*. *J Biol Chem.*1991; 266(22): 14431-4.

Vercesi, A. E., M. E. Hoffmann, et al. Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. *Cell Calcium.* 1991; 12(5): 361-9.

Wood, N. C. e K. M. Nugent. Inhibitory effects of chlorpromazine on *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.*1985; 27(5):692-4.

World Health Organization. [database]. Available from: <<http://www.who.int/dr>>. Cited from: 2010 Jun 2011.

Zeise, M. L., S. Kasparov, et al. Acamprosate (calcium acetylhomotaurinate) decreases postsynaptic potentials in the rat neocortex: possible involvement of excitatory amino acid receptors. *Eur J Pharmacol.*1993; 231(1):47-52.

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