

LUCAS SOUZA DE CASTRO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE INIBIDORES DE
HISTONAS DESACETILASES E TOPOISOMERASES
NO *TRYPANOSOMA CRUZI* E NA VIABILIDADE DE
CÉLULAS HOSPEDEIRAS.



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2017

Trabalho realizado no Departamento de Biologia Celular e Parasitologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação do Professor Dr Wanderley de Souza e coorientação da Dr^a Aline Araújo Zuma.

FICHA CATALOGRÁFICA

S355 a Souza de Castro, Lucas
Avaliação dos Efeitos de Inibidores de Histonas Desacetilases e Topoisomerases no Trypanosoma cruzi e na Viabilidade de Células Hospedeiras. / Lucas Souza de Castro. -- Rio de Janeiro, 2017.
62 f.

Orientador: Wanderley de Souza.
Coorientadora: Aline Araújo Zuma.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Trypanosoma cruzi. 2. inibidores. 3. histona desacetilase. 4. topoisomerase. 5. viabilidade. I. de Souza, Wanderley, orient. II. Araújo Zuma, Aline, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCAS SOUZA DE CASTRO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS INIBIDORES DE HISTONAS
DESACETILASES E TOPOISOMERASE NOS *TRYPANOSOMA CRUZI* E NA
VIABILIDADE DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS.

Rio de Janeiro,.....de..... de.....

(André Luis Souza dos Santos, Professor Associado do IMPG - UFRJ)

(Leandro Stefano Sangenito, Doutor pelo IMPPG - UFRJ)

(Sara Teixeira de Macedo Silva, Doutora pelo IBCCF - UFRJ)

(Angela Hampshire Lopes, Professora Titular do IMPG - UFRJ)

AGRADECIMENTOS

- Ao meu DEUS, por toda a graça e bondade! Por ter sido meu socorro bem presente e Rocha firme. E permitir que tudo isso acontecesse.
- Aos meus pais, por todo apoio, amor, cumplicidade, força, amizade e extrema dedicação desde sempre.
- Ao meu orientador, professor Wanderley de Souza, pela oportunidade.
- À minha orientadora, Dr^a Aline Zuma, por toda paciência e dedicação, e por ter sido a melhor orientadora do mundo.
- Às minhas professoras Carolina Neumann Keim e Renata Campos Azevedo, por toda ajuda, direcionamento e preocupação.
- À todos os membros do LUCHM, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.
- Aos familiares, por todas as palavras de incentivo.
- Aos amigos, por todos os momentos de alegria e por me ajudarem sempre.
- À todos os professores de Microbiologia e Imunologia, que foram fonte de inspiração durante esses quatro anos.
- Ao Prof André Luis Souza dos Santos, Dr Leandro Stefano Sangenito, Dr^a Sara Teixeira de Macedo Silva e a Prf^a Angela Hampshire Lopes, por cordialmente aceitarem fazer parte da banca examinadora, e contribuírem para o meu trabalho.

RESUMO

LUCAS SOUZA DE CASTRO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES E TOPOISOMERASES NO *TRYPANOSOMA CRUZI* E NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS.

Orientadores: Dr Wanderley de Souza & Dr^a Aline Araújo Zuma

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é o protozoário agente etiológico da Doença de Chagas, descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909. Esta é uma das treze doenças negligenciadas do mundo, predominantemente distribuída pela América Latina. Cerca de 10 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo parasito, levando à necessidade do desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento desta enfermidade. Uma nova estratégia para a pesquisa de drogas antiparasitárias é a utilização de compostos que têm como alvo histonas desacetilases (HDACs) e topoisomerases (Topo). Estas são enzimas envolvidas com a organização do DNA nuclear, essenciais para a replicação e diferenciação do parasito, em suas formas evolutivas. O projeto em questão tem como intuito investigar o efeito de novos compostos inibidores de HDAC, KV46 e KV24; e de topoisomerases, 3a, 3e, 3f; contra as formas epimastigotas do parasito. Para tal, foram realizadas curvas de crescimento, experimentos de viabilidade celular e microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e varredura (MEV). Nossos resultados demonstraram alterações tanto na proliferação quanto na viabilidade dos parasitos, nas maiores concentrações testadas dos inibidores. A viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂, após 96 horas de tratamento, foi reduzida em 30 e 50% quando tratadas pela maior concentração, 50 μ M, dos compostos KV46 e KV24, respectivamente. No entanto, não sofreram efeito citotóxico significativo quando tratadas com os inibidores de Topo. As análises por MET com as drogas KV46

e KV24 demonstraram alterações na estrutura paraflagelar e diminuição do kDNA. Acúmulos de corpos lipídicos e desorganização do complexo de Golgi foram observados nos parasitos tratados com os inibidores de topoisomerasas. Já a microscopia eletrônica de varredura apontou torção e arredondamento do corpo celular dos parasitos tratados com os inibidores. Concluimos, portanto, que os novos inibidores testados têm se demonstrado eficientes para o controle da proliferação do parasito, ao mesmo tempo que apresentam baixa toxicidade em linhagem celular de mamífero, sendo assim, importantes para novos estudos quimioterápicos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; inibidores; histona desacetilase; topoisomerase; viabilidade.

ABSTRACT**LUCAS SOUZA DE CASTRO****AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES E TOPOISOMERASES NO *TRYPANOSOMA CRUZI* E NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS.****Orientadores: Dr Wanderley de Souza & Dr^a Aline Araújo Zuma**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is the etiological agent of Chagas disease, which was described in 1909 by the Brazilian doctor Carlos Chagas. This is one of the thirteen neglected diseases in the world, predominantly in Latin America. There are about 10 million people infected by the parasite, which highlights the necessity of more effective and less toxic therapies to that patients. A new strategy is the use of drugs whose target are histone deacetylases (HDACs) and topoisomerases (Topo). These enzymes are involved with nuclear DNA organization, which is essential for parasite replication and differentiation. The present project aims to investigate the effects of novel compounds that inhibit HDAC, KV46 and KV24; and Topo, 3a, 3e and 3f against the epimastigote form of the parasite. For this purpose, we performed proliferation, viability and electron microscopy assays. Our results showed alterations on parasite proliferation and viability, when the highest concentrations were used. LLC-MK2 viability was reduced after 96 hours of treatment, when treated with the highest concentration, 50 μ M, of the compounds KV46 and KV24. However, Topo inhibitors did not significantly affect cells viability. Transmission electron microscopy analyses of treated parasites with KV46 and KV24 revealed modifications on paraflagellar rod and reduction of the kDNA size. Accumulation of lipid bodies and Golgi complex disorganization were also observed after treatment with Topo inhibitors. By scanning electron microscopy, we observed rounded and twisted parasites. Thus, we conclude

that these inhibitors are efficient against parasite proliferation, whereas they cause low toxicity to LLC-MK2 cells, being promising compounds for further chemotherapeutic studies.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; inhibitors; histone desacetylases; topoisomerase; viability.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> : ciclo biológico e a doença de Chagas.....	1
1.1.1 A Doença.....	4
1.1.2 Tratamento.....	8
1.2 Ultraestrutura Celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.3 Histonas Desacetilases.....	12
1.4 Topoisomerases.....	14
1.5 Inibidores de Histonas Desacetilases.....	15
1.6 Inibidores de Topoisomerases.....	16
II. JUSTIFICATIVA.....	18
III. OBJETIVOS.....	19
3.1 Geral.....	19
3.2 Específicos.....	19
IV. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Cultivo Celular.....	20

4.2 Curvas De Crescimento.....	20
4.3 Viabilidade Celular.....	21
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	21
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	22
V. RESULTADOS.....	24
5.1 Efeito dos Inibidores de Histonas Desacetilases e Topoisomerases Sobre a Proliferação Celular.....	24
5.2 Efeito dos Inibidores na Viabilidade Celular.....	28
5.3 Efeito dos Inibidores de Sobre a Viabilidade Celular das culturas de LLC-MK ₂	32
5.4 Efeitos dos Inibidores na Ultraestrutura e Morfologia Celular.....	36
VI. DISCUSSÃO.....	41
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

I. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*: ciclo biológico e a doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é um protozoário do filo Sarcomastigophora, do subfilo Mastigophora, da ordem Kinetoplastea, pertencente à família Trypanosomatidae (Rassi *et al.*, 2012). O parasito é o agente etiológico da doença de Chagas, descrita primeiramente de forma detalhada, incluindo todo o ciclo de transmissão e manifestações clínicas da doença, pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas, em 1909 (Chagas *et al.*, 1909; Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012). O protozoário é um parasito que possui três diferentes estágios de desenvolvimento, o que é importante para o estabelecimento do seu ciclo, que envolve obrigatoriamente a passagem tanto em hospedeiros invertebrados quanto em vertebrados (Rodrigues *et al.*, 2002; Girard-Dias *et al.*, 2012).

A doença de Chagas é transmitida para os humanos por insetos sugadores de sangue (Rassi *et al.*, 2010) pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, e da subfamília Triatominae (Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). Embora 140 espécies de triatomíneos tenham sido identificadas, somente alguns são competentes vetores para *T. cruzi* (Rassi *et al.*, 2012). As três principais espécies relacionadas são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, distribuídos ao longo das Américas (Magallón-Gastélum *et al.*, 1998; Rassi *et al.*, 2010; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). Esses insetos, conhecidos como "barbeiro" na América do Sul, possuem o papel principal na transmissão da doença em humanos e em outros mamíferos, pois ao picar seus hospedeiros em busca de sangue, excretam fezes contaminadas com o parasito, podendo levar ao estabelecimento da infecção (Magallón-Gastélum *et al.*, 1998; Waleckx *et al.*, 2015).

Geralmente, os barbeiros possuem atividade noturna (Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013) e afetam principalmente as áreas rurais, onde as condições ecológicas juntamente com os hábitos culturais, além do fator socioeconômico, são favoráveis para o estabelecimento do vetor na moradia dos habitantes (Magallón-Gastélum *et al.*, 1998). As "casas de pau a pique" ou choupanas, de estrutura altamente estável, e feitas sem reboco nas paredes e cobertas com palha, oferecem uma variedade

de locais de esconderijo e instalação desses insetos. Durante à noite, na ausência de luz, os insetos hematófagos saem de seus esconderijos, que podem ser tanto nas rachaduras das paredes como nos telhados, ou até mesmo atrás de objetos, e picam o homem, geralmente na região do rosto (Chagas, 1909; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013).

A transmissão da doença ocorre principalmente pelos vetores, de 80% a 90% dos casos (Rodrigues *et al.*, 2002). No entanto, também pode ocorrer por outras formas, como pela transfusão de sangue, com risco de contaminação de menos de 10% a 20% por uma unidade de sangue; e verticalmente da mãe para o filho, em qualquer período da gestação, variando de 1-12% em relação à região geográfica (Rassi *et al.*, 2010; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013; Abras A *et al.*, 2017). Inclusive, são essas as principais causas de infecção de países não endêmicos e em zonas urbanas (Rassi *et al.*, 2012). Essa transmissão pode também ser relacionada, de forma rara, porém ocorrente, pela ingestão de alimentos e líquidos onde está presente o parasito, como o suco de cana de açúcar, açaí, e ainda mais raramente, em acidentes em laboratório envolvendo profissionais que trabalham diretamente com culturas de células e/ou animais infectados com o protozoário (Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012).

Como dito anteriormente, *Trypanosoma cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida envolvendo diferentes hospedeiros, insetos vetores e mamíferos, e diferentes estágios de desenvolvimento morfológicos (Rassi *et al.*, 2010). Uma das formas de desenvolvimento do protozoário é a amastigota, forma intracelular replicativa em hospedeiros vertebrados, que possui formato esférico, um pequeno flagelo e cinetoplasto localizado anterior ao núcleo (Burleigh *et al.*, 1995; De Souza, 2002).

A epimastigota é uma forma não infectante, replicativa, residente no trato digestório de hospedeiros invertebrados, que apresenta formato fusiforme, com largura em torno de 20-40 μm , e cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo. As tripomastigotas são as formas infectantes, de formato alongado, com comprimento de aproximadamente 25 μm e cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo (Burleigh *et al.*, 1995; De Souza, 2002; Zuma *et al.*, 2007) (Figura 1).

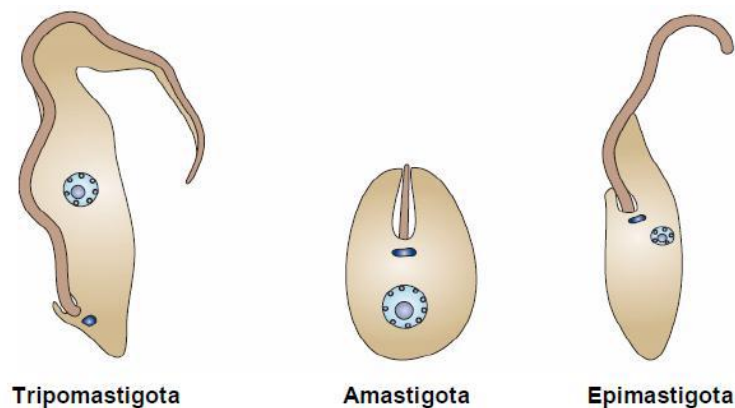


Figura 1: Representação das três formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*, tripomastigota, amastigota e epimastigota, respectivamente, definidas por seus formatos celulares, tamanho do flagelo, e posição do cinetoplasto e do núcleo (adaptado de Docampo *et al.*, 2005).

O ciclo biológico nos hospedeiros invertebrados (De Souza, 2002), pertencentes à família Reduviidae (Burleigh e Andrews, 1995), ocorre pela alimentação do sangue de mamíferos. Nesse período, as formas de tripomastigotas presentes no sangue são ingeridas. No estômago, os tripomastigotas se diferenciam para epimastigotas, que se dividem no intestino dos insetos (De Souza, 2002), chegando até a porção final do mesmo (Rassi *et al.*, 2012), o reto, onde começam a assumir a forma de tripomastigotas metacíclicos. No reto, esses tripomastigotas são eliminados juntamente com as fezes e urina, sendo capazes de infectar os hospedeiros vertebrados (De Souza, 2002) através da mucosa ou por lesão pré-existente, ou ainda pela lesão causada pelo próprio hospedeiro vertebrado ao coçar o local da picada (Rassi *et al.*, 2012).

Alternativamente, os parasitos podem atravessar a conjuntiva, mesmo na ausência de lesão cutânea. A reação cutânea que corre no sítio de infecção é chamada de chagoma de inoculação (Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). Ao entrar no hospedeiro vertebrado, uma das primeiras células com a qual entram em contato são os macrófagos (Burleigh *et al.*, 1995). Os parasitos são fagocitados por essas células, formando um vacúolo parasitóforo limitado por membrana, onde haverá fusão deste com os lisossomos das células hospedeiras, que descarregarão seu conteúdo citoplasmático, visando a morte do parasito (De Carvalho *et al.*, 1989). No entanto, a membrana do vacúolo começa a ser degradada gradativamente por uma enzima liberada pelo protozoário (De Souza, 2002), que escapa do vacúolo e consegue sobreviver em contato direto com o citoplasma da célula (De Carvalho *et al.*, 1989).

O ciclo de diferenciação tem duração média de quatro a cinco dias, sendo o período da internalização do parasito e a destruição do vacúolo de uma a duas horas,

após a invasão (Burleigh e Andrews, 1995). Progressivamente, os tripomastigotas assumem uma forma arredondada a oval e se diferenciam para a forma amastigota, estágio replicativo intracelular (De Souza, 2002). Após um período de vinte horas, os amastigotas começam a se dividir por divisão binária. Completado o período de divisão, os amastigotas são novamente diferenciados para tripomastigotas (Burleigh e Andrews, 1995). Ao final do ciclo de diferenciação, a intensa movimentação dos parasitos, que agora possuem um longo flagelo, ajuda na ruptura da célula e na sua liberação para o sangue periférico, onde podem infectar outras células ou mesmo serem ingeridos pelo vetor hematófago, completando seu ciclo de vida (Burleigh e Andrews, 1995; De Souza, 2002) (Figura 2).

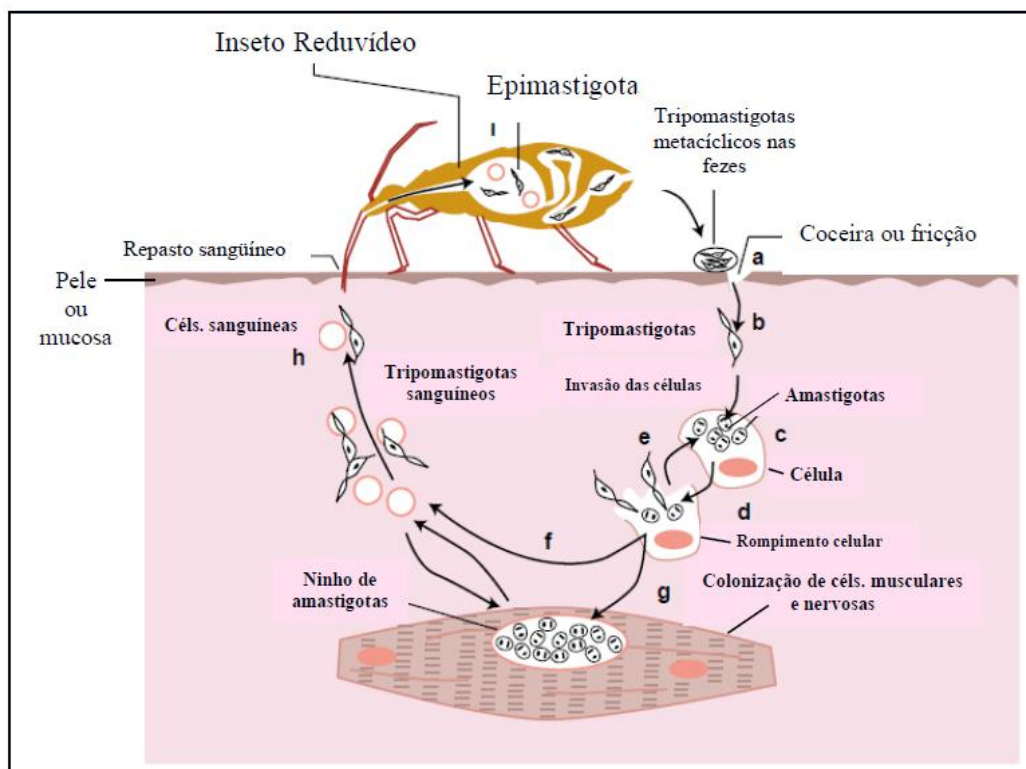


Figura 2: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (a) Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca na pele do hospedeiro; (b) Os tripomastigotas metacíclicos, que entram em contato com a corrente sanguínea, (c) infectam células e tomam a forma de amastigota e se multiplicam no citoplasma. Após o processo de divisão, as formas amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas (d) rompendo a célula, (e) podendo infectar novas células, (f) ser reintroduzidos na corrente sanguínea, (g) ou mesmo, colonizar novas células em diferentes tecidos. (h) No sangue periférico, os tripomastigotas podem ser novamente ingeridos pelo inseto. (i) No estômago do inseto o *T. cruzi* irá assumir a forma epimastigota e na porção final do intestino do mesmo, assume a forma de tripomastigota metacíclico, completando o ciclo do protozoário (adaptado de Macedo *et al.*, 2002).

1.1.1 A Doença

A doença de Chagas passa por dois sucessivos estágios, fase aguda e fase crônica. A entrada do parasito produz uma reação da pele, levando ao surgimento de um chagoma. Outro possível sítio de infecção, por meio do qual não há contato com a pele, é pela conjuntiva, acometendo um dos olhos o que caracteriza o sinal de Romana. Sinal este que consiste em edema indolor nas pálpebras e conjuntivas, e linfadenite. Um achado característico da fase aguda, que favorece o diagnóstico em regiões endêmicas. No entanto, um diagnóstico diferenciado é necessário para excluir outras doenças que apresentam sintomas semelhantes (Dias *et al.*, 1956; Dias Jr, 1997; Rassi *et al.*, 2012; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013).

A fase aguda da doença é geralmente assintomática, fator relacionado à baixa carga parasitária, e apresenta duração média de 6 a 8 semanas, porém apresenta taxa de mortalidade de 2% a 8%. A fase inicial pode ocorrer em todas as faixas etárias, com maior frequência em crianças das idades entre 1 aos 5 anos. *T. cruzi*, ao entrar em contato com a corrente sanguínea, pode invadir e se multiplicar em diferentes células hospedeiras, além dos macrófagos, como as células do músculo liso e estriado, fibroblastos e até mesmo os neurônios. Com isso, podem ser observados sintomas como edema subcutâneo, localizado ou generalizado, congestionamento vascular, infiltração celular que pode evoluir rapidamente para linfadenite regional. Além de quadros de febre prolongada, variando entre 37°C a 40°C, mal-estar, e aumento do fígado, baço e linfonodos. Exames de eletrocardiograma podem mostrar sinais de envolvimento cardíaco, sendo a maioria das mortes na fase inicial da doença devido à insuficiência cardíaca (Chagas *et al.*, 1909; Dias *et al.*, 1956; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013; Rodrigues *et al.*, 2002; Rassi *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2010;).

Além desses sintomas, alguns pacientes ainda podem desenvolver, com ocorrência rara, perturbações funcionais do sistema nervoso, desenvolvendo meningoencefalites, convulsões e perda de consciência. Quadro este responsável por 50% das mortes que acometem, na maioria dos casos, crianças de dois a três anos de vida (Chagas *et al.*, 1909; Dias *et al.*, 1956; Rodrigues *et al.*, 2002; Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). No entanto, as manifestações da fase aguda se resolvem espontaneamente em 90% dos casos, mesmo

sem tratamento específico, e cerca de 70-80% desses pacientes não desenvolvem manifestações clínicas (Rassi *et al.*, 2010).

A fase crônica se inicia após o período da fase inicial, ou seja, posterior ao desaparecimento das manifestações clínicas e quando os níveis da parasitemia são indetectáveis. Nessa fase, há detecção de anticorpos IgG contra o parasito no soro e nenhuma evidência de dano em órgãos é observada (Rassi *et al.*, 2012; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). Cerca de 50% a 70% dos indivíduos infectados irão permanecer na fase indeterminada por toda a vida (Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013), sem apresentar sintomas (Rassi *et al.*, 2012). A maioria desses pacientes apresentam idades dentre 20 e 50 anos (Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). Porém, outros indivíduos, cerca de 30% a 40%, desenvolvem a fase determinada, geralmente 10 a 30 anos após a infecção inicial (Rassi *et al.*, 2012). As manifestações clínicas típicas dessa fase estão relacionadas com o envolvimento patológico de determinados órgãos, como o coração, esôfago e cólon, agrupados em três formas majoritárias: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Rassi *et al.*, 2010).

A forma digestiva é caracterizada por alterações nas funções motoras, secretória e absorviva do esôfago e trato gastrointestinal (Rassi *et al.*, 2012). As disfunções gastrointestinais, principalmente megaesôfago ou megacólon, ocorrem em cerca de 10% a 15% dos indivíduos (Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012). A forma cardíaca é a mais séria e frequente manifestação na fase crônica, se desenvolve em cerca de 20% a 30% dos indivíduos. A forma cardiodigestiva, por sua vez como o nome sugere, é a junção das duas formas da doença (Rassi *et al.*, 2012).

Entre 1999 a 2007, a doença de Chagas foi considerada como a quarta principal causa de morte no Brasil, com cerca de 53.930 óbitos, sendo a maioria dos casos relacionados as formas cardíacas da doença, e os menos numerosos, com a forma digestiva. Entre os anos 2000 e 2010, também se observou uma grande estimativa de mortes em idosos do sexo masculino, acometidos, principalmente, pela forma cardíaca (85,9%). Hoje em dia, estima-se que o número de casos de indivíduos infectados pelo parasita no país, seja cerca de 2 a 3 milhões (Dias, Borges-Pereira e Macedo, 2013; Dias *et al.*, 2016)

Um dos passos mais importantes para o tratamento do paciente é o diagnóstico da doença. Durante a fase aguda, os diagnósticos são baseados na detecção das formas

tripomastigota no sangue. Na fase crônica, por conta da baixa parasitemia, são realizados testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos imunoglobulina G (IgG) (Dias *et al.*, 1956; Médecins Sans Frontières, 2008; Rassi *et al.*, 2012; Seiringer *et al.*, 2017) específicos para os antígenos de *T. cruzi* (B13, 1F8 E H49/JL7) (Egüez *et al.*, 2017). Os testes convencionais mais utilizados são Hemaglutinação Indireta (HAI) , Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA (do inglês "Enzyme Linked Immunosorbent Assay") (Luquetti *et al.*, 1998; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013).

A obtenção de resultados positivos em mais de um dos testes citados é considerado como um diagnóstico definitivo para a doença (Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). No entanto, os marcadores sorológicos são evidências indiretas de infecção por *T. cruzi*, pois ocorrem independentemente da presença do parasito, pelo fato dos anticorpos persistirem no sangue do paciente anos após o tratamento. Portanto, deve haver um monitoramento durante o mesmo (Seiringer *et al.*, 2017).

Os testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) não são realizados nos diagnósticos de rotina por conta da baixa padronização, pelo potencial de contaminação cruzada de DNA, por variação de resultados pelos laboratórios e países, e a necessidade de instalações laboratoriais específicas. Por outro lado, devido a sua maior sensibilidade em relação aos outros testes, é muito utilizado em casos sorológicos inconclusivos, para confirmação do diagnóstico, e como um método auxiliar para monitorar o tratamento (Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012).

1.1.2 Tratamento

O tratamento da doença de Chagas visa a cura da doença ainda na fase aguda, o que irá prevenir danos aos órgãos na fase crônica da infecção, diminuir a severidade e duração dos sintomas, além de diminuir as mortalidades. Desde os anos 70, apenas dois fármacos são indicados para o tratamento, benznidazol e nifurtimox, porém, no Brasil e em alguns países latinos, o uso do nifurtimox foi descontinuado. Por ter uma maior tolerância, o benznidazol (derivado do nitroimidazol) é adotado como tratamento de primeira linha. O composto possui atuação contra as formas amastigota e tripomastigota

do parasito. No entanto, apresenta efeitos colaterais diversos como: dermatites alérgicas, que atingem de 20% a 30% da população, sintomas de hipersensibilidade, linfadenopatia, dor articular e muscular, além de depressão da medula óssea. Em casos mais severos, porém menos comuns (atingindo entre 5% a 10% dos pacientes), pode ocorrer neuropatia periférica dose dependente geralmente no final do tratamento afetando principalmente a parte distal dos membros inferiores. Tais efeitos colaterais podem levar à interrupção do tratamento por parte do próprio paciente (Rodrigues *et al.*, 2002; Bern *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012).

O composto nifurtimox também apresenta atuação nas formas amastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, e é associado a vários efeitos adversos que geralmente desaparecem quando o tratamento é interrompido. Sintomas gastrintestinais são os maiores efeitos reportados por 50% dos pacientes, além de anorexia, náusea, vômito, desconforto abdominal e ocasionalmente diarreia. Contudo, as crianças possuem maior tolerância a maiores doses e menos efeitos colaterais que em indivíduos adultos em ambos compostos citados. Na fase crônica de infecção, o tratamento é eficaz em cerca de 10-20% dos pacientes. Por outro lado, os maiores resultados de cura são durante a fase aguda podendo chegar a 60% de chance (Rodrigues *et al.*, 2002; Bern *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012).

Além dos fatores relacionados aos efeitos colaterais por ambos os compostos, estudos apontaram resistência por parte de algumas cepas, ao tratamento com as drogas (Rassi *et al.*, 2010; Centro de Controle de Doenças [CDC], 2013). Por essas e outras razões, se faz necessário o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas para a doença de Chagas (Egüez *et al.*, 2017). O estudo das estruturas básicas de *Trypanosoma cruzi* permite a identificação de novos alvos para quimioterapia, o que tem permitido o desenvolvimento de novos compostos contra o protozoário (Rodrigues *et al.*, 2002).

1.2 Ultraestrutura Celular de *Trypanosoma cruzi*.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é um eucarioto e, portanto, possui uma organização ultraestrutural clássica, com algumas organelas também encontradas em células de mamíferos. No entanto, possui um conjunto de organelas que são exclusivas

dos tripanossomatídeos (figura 3). Esses protozoários possuem um citoesqueleto diferenciado, composto de um arranjo de microtúbulos subpeliculares conectados entre si e por curtos filamentos. Esta organização é ainda responsável pela rigidez e formato da célula. Os microfilamentos participam também do controle dos movimentos das macromoléculas e estruturas intramembranares, além do movimento de toda a célula (De Souza, 2002; Do Campo *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2014).

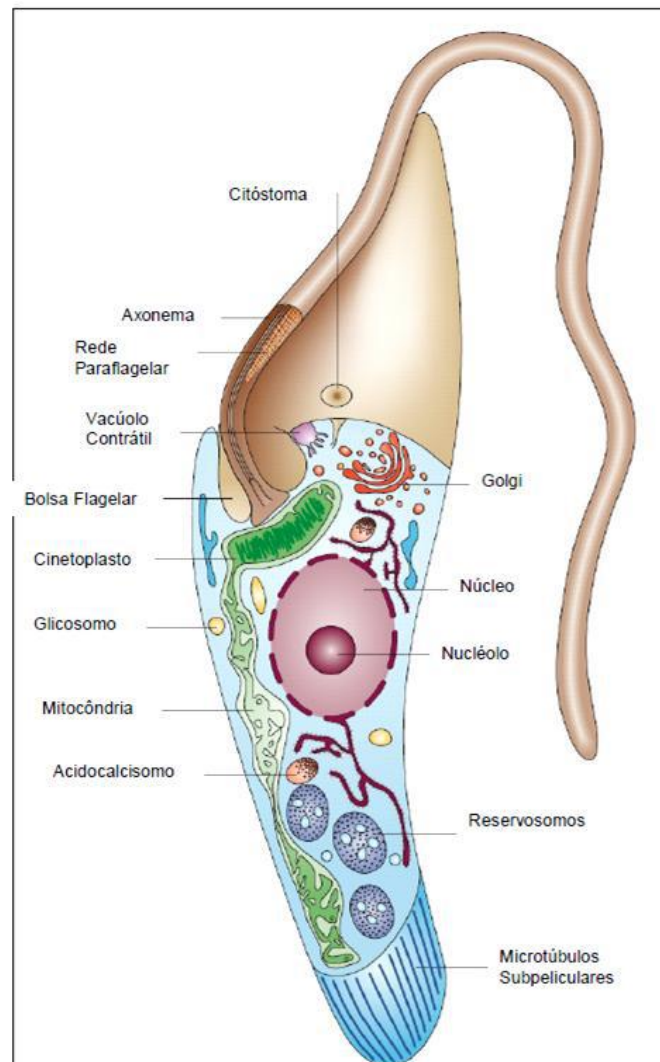


Figura 3. Representação esquemática ultraestrutural da forma evolutiva epimastigota (adaptado de Do Campo *et al.*, 2005).

Todos os membros da família Trypanosomatidae possuem um flagelo que emerge de uma invaginação denominada de bolsa flagelar. A estrutura do flagelo é formada por um padrão 9 + 2 pares de microtúbulos axonais e sua dimensão varia de acordo com as fases de desenvolvimento do *T. cruzi*. Nos epimastigota e tripomastigota o axonema está conectado à estrutura paraflagelar, um complexo de filamentos paracristalinos organizado paralelamente ao axônio. Eles são importantes para a motilidade celular e viabilidade em certos estágios de desenvolvimento (De Souza, 2002; Santos *et al.*, 2014). A bolsa flagelar, como citado anteriormente, é encontrada na porção anterior da célula, a partir da qual, o flagelo emerge. É uma região da superfície dos tripanosomatídeos altamente especializada, que não possui os microtúbulos subpeliculares, e importante para as atividades de endocitose e exocitose da célula (De Souza, 2002).

A mitocôndria dos tripanosomatídeos é única e ramificada, e se estende ao longo do citoplasma do parasita. Em uma determinada porção da mitocôndria, há uma região conhecida como cinetoplasto, onde está localizado o DNA mitocondrial (kDNA). Esta estrutura é utilizada como forma de identificar a ordem Kinetoplastea, à qual pertence a família Trypanosomatidae. O kDNA é composto por uma rede de milhares de círculos de DNA interligados. Esses círculos são chamados de maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos codificam os RNAs ribossomais e algumas proteínas requeridas para processos bioenergéticos. Os minicírculos por sua vez codificam os RNAs guias, que atuam na edição dos transcritos de RNA codificados pelos maxicírculos (Morris *et al.*, 2001; De Souza, 2002; Santos *et al.*, 2014;).

O ácidocalcissomo por sua vez é uma organela de formato arredondado, contendo um conteúdo amorfo e elétron-denso. Pode ser encontrada ao longo da célula, preferencialmente na porção central do corpo celular. Suas funções estão associadas a estocagem de íons, regulação do pH intracelular e na osmoregulação (Do Campo *et al.*, 2005).

Os glicossomos são um tipo especial de peroxissomos, distribuídos por toda a célula, e responsáveis pela via glicolítica da mesma (De Souza, 2002) As formas epimastigota e amastigota apresentam ainda uma estrutura altamente especializada chamada de complexo citóstoma-citofaringe, responsável pelas vias endocíticas. Estes protozoários endocitam macromoléculas, envolvidas por vesícula, que serão

posteriormente concentradas em organelas chamadas de reservossomo. Essas estruturas acumulam todas as macromoléculas ingeridas e são importantes para o processo de diferenciação celular (De Souza, 2002).

O núcleo de *Trypanosoma cruzi*, e dos outros tripanosomatídeos, possui uma organização estrutural semelhante à das células eucarióticas. Medindo cerca de 2,5 μm , o núcleo contém todas as informações vitais para os protozoários, além de controlar os processos de diferenciação. As diferentes formas de desenvolvimento do parasito apresentam distintos formatos em seus núcleos. Os tripomastigotas possuem núcleo alongado e localizado na porção central da célula. Já as formas amastigota e epimastigota possuem o núcleo de formato arredondado (De Souza, 2002).

Durante a divisão, ocorrem mudanças na organização do material nuclear: a cromatina, localizada abaixo da membrana nuclear, e o nucléolo são dispersos em todo o núcleo, dando um aspecto homogêneo ao mesmo. Após a replicação do corpo basal, os microtúbulos do fuso mitótico aparecem dentro do núcleo dos tripanossomatídeos. O núcleo, que possui um formato esférico, torna-se mais oval. O alongamento do núcleo com massas de cromatina unidas ao envelope nuclear representa uma etapa posterior ao processo de divisão. Quando a divisão é completada, a cromatina e o nucléolo são reorganizados e assumem o aspecto e a posição observados nas células em intérfase. Além disto, os microtúbulos do fuso mitótico intranuclear desaparecem (Vickerman *et al.*, 1970; De Souza, 2002).

1.3 Histonas Desacetilases

A compactação e o empacotamento do material genético da célula, como anteriormente descrito, são possíveis devido à atuação de determinadas proteínas, as histonas. Essas enzimas são proteínas importantes, ricas em aminoácidos - arginina e lisina, e que permitem o acesso a fatores que regulam processos como a transcrição de genes, replicação e reparo do DNA (Olins *et al.*, 2003; Alsford *et al.*, 2004; Monneret, 2005; Shahbazian *et al.*, 2007).

As histonas estão presentes em todo o comprimento do DNA, constituindo um octâmero formado por quatro pares de histonas, dois dímeros H2A – H2B, e um tetrâmero H3 e H4. A associação deste octâmero com cerca de 140 pares de bases do DNA forma os nucleossomos, que são a subunidade fundamental de repetição da cromatina e o primeiro nível de empacotamento de ordem superior do DNA (figura 4) (Olins *et al.*, 2003; Alsford *et al.*, 2004; Monneret, 2005; Shahbazian *et al.*, 2007). Os padrões estruturais e organizacionais das histonas dos tripanossomatídeos são bem similares àqueles dos eucariotos superiores. Em relação à organização nucleossomal, esses protozoários possuem o mesmo core de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e algumas variantes, H2AZ, H2BV, e H3V, além da histona ligante H1. Contudo, são menos conservadas em relação a outros eucariotos, possuindo mecanismos peculiares de controle de expressão gênica, e não são dotados da porção globular da histona H1 (De Jesus *et al.*, 2016; Picchi *et al.*, 2017).

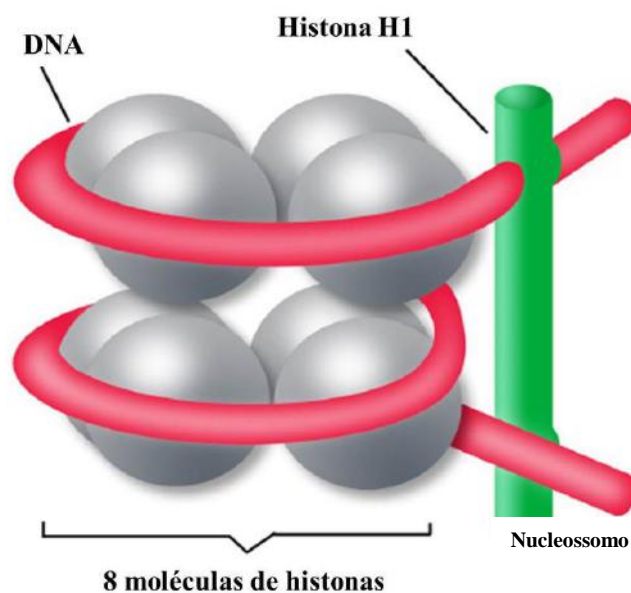


Figura 4. Representação do nucleossomo. Fita de DNA enrolada no core das histonas (Adaptado de Monneret, 2005).

Nos tripanossomatídeos há toda uma maquinaria necessária para a modificação da cromatina, associadas às diferentes modificações pós-traducionais (PTMs). A porção N-terminal, presente na estrutura do nucleossomo, atua como alvo para as PTMs tais como, acetilação, desacetilação, ubiquitinação e metilação (Shahbazian *et al.*, 2007; De

Jesus *et al.*, 2016; Picchi *et al.*, 2017). As enzimas responsáveis pela acetilação e desacetilação são as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs), respectivamente (Monneret, 2005).

As novas proteínas histonas são produzidas na fase de síntese (S), quando o DNA é replicado. Após a síntese, as histonas são rapidamente modificadas pelas histonas acetiltransferases (HATs), que catalisam a transferência de uma unidade acetil, da acetil coenzima A, para o grupo ϵ -amino de resíduo de lisina (Shahbazian *et al.*, 2007). A neutralização da carga positiva de resíduos de lisina na cauda N-terminal leva ao afrouxamento do contato das histonas com o DNA, relaxando-o. A desacetilação, ao contrário da acetilação, leva à remoção do grupo acetila do grupo ϵ -amino das cadeias laterais de lisina. Dessa forma, a desacetilação irá induzir uma repressão transcricional em função da condensação da cromatina (Monneret, 2005) (figura 5).

Essas mudanças pós-traducionais, portanto, irão contribuir para a regulação de numerosos processos biológicos, tais como controle transcricional, progressão do ciclo celular e apoptose (Chua *et al.*, 2017).

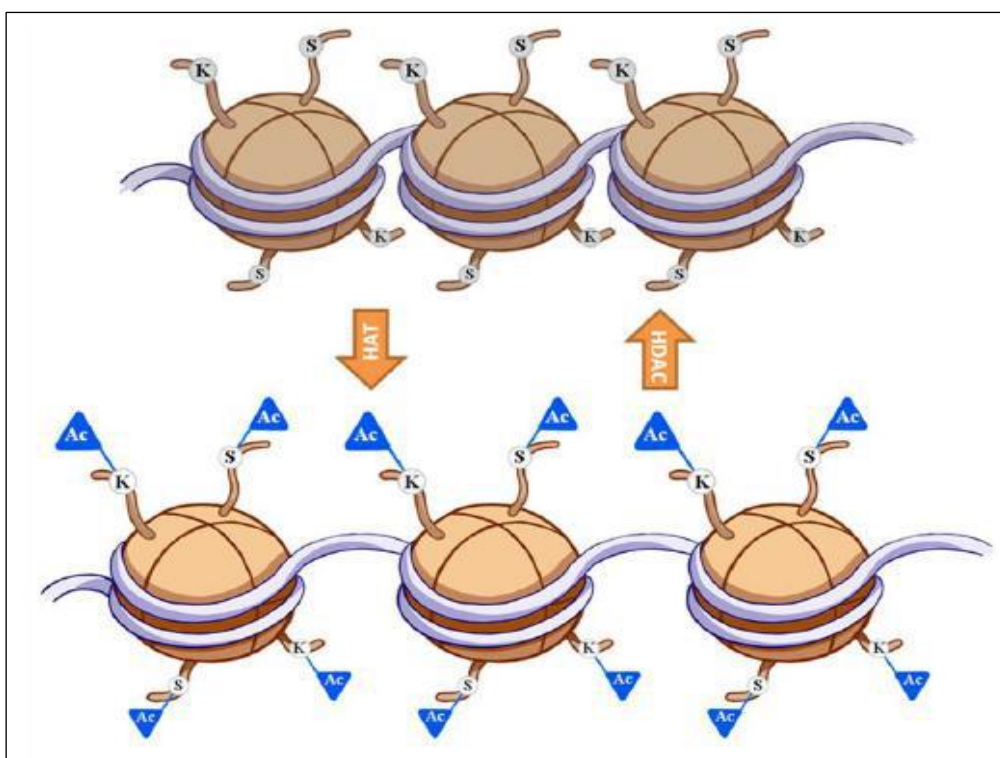


Figura 5. Representação esquemática da acetilação e desacetilação, desencadeadas pela histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC), respectivamente (Santos , 2014).

1.4 Topoisomerases

As topoisomerases, assim como as histonas, participam diretamente dos processos envolvendo o material genético da célula (Balaña-Fouce *et al.*, 2014). A estrutura organizacional dos compartimentos como o núcleo e o cinetoplasto dependem dessas enzimas, que desempenham papel fundamental durante a replicação, transcrição, recombinação e reparo (Lacombe *et al.*, 2014).

O DNA apresenta uma organização compacta, negativamente superenrolada, que não é acessível para a maioria dos processos celulares. Por essa razão, o superenrolamento do DNA deve tomar uma forma mais relaxada para que seja possível o acesso da polimerase, fatores transcricionais e proteínas de reparo do DNA. As topoisomerases são as proteínas responsáveis por relaxar o material genético, introduzindo quebras em uma ou nas duas fitas da dupla hélice (Balaña-Fouce *et al.*, 2014).

As DNA topoisomerases são classificadas em tipo I e tipo II. As topoisomerases do tipo I são enzimas independentes de ATP, que se ligam ao DNA e promovem a quebra de uma fita da dupla hélice, que pode girar em torno do seu próprio eixo para reverter o superenovelamento (Balaña-Fouce *et al.*, 2014). As do tipo I podem ser classificadas como membros da superfamília de tipo IA, enzima que reverte o superenrolamento positivo através da ligação covalente transitória com a extremidade 5' fosfato. Ou podem ser classificadas como tipo IB, que reverte tanto o superenovelamento negativo como o positivo pela ligação à extremidade 3' fosfato (Champoux, 2001; Balaña-Fouce *et al.*, 2014).

As topoisomerases do tipo II, por sua vez, são dependentes de ATP e se ligam à subunidade 5' fosfato do DNA, relaxando o superenovelamento tanto positivo como o negativo; e clivam as duas fitas da dupla hélice. Uma mudança conformacional puxa as duas extremidades das fitas cortadas, criando uma abertura por onde passa a segunda fita de DNA (Champoux, 2001; Balaña-Fouce *et al.*, 2014). Essas enzimas, portanto, apresentam grande importância para a manutenção do ciclo celular (Jobe *et al.*, 2012).

1.5 Inibidores de Histonas Desacetilases

Uma estratégia promissora para a pesquisa de novos compostos antiparasitários são os estudos de inibidores de histonas desacetilases (HDACi) (Martínez-Iglesias *et al.*, 2008; Melesina *et al.*, 2015). As HDACs têm sido utilizadas como alvo para o tratamento de certos tipos de câncer, além de estarem sendo utilizadas como alvo para doenças neurodegenerativas, cardíacas, inflamatórias e imunes, desordens metabólicas, além das parasitárias (Melesina *et al.*, 2015).

Os inibidores de HDAC (HDACi), que são capazes de inibir a atividade de diferentes classes destas enzimas, podem ser divididos em alguns grupos químicos: os derivados de ácido hidroxâmico, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos de cadeia curta e benzamidas (Melesina *et al.*, 2015).

Como alguns exemplos de uso desses inibidores tem-se a Tricostatina A (TSA), um dos primeiros inibidores de HDACs, da classe dos hidroxamatos, identificados como um potente e específico inibidor para o tratamento de células tumorais (Monneret, 2005). E também o SAHA, um dos primeiros aprovados para uso clínico no tratamento de pacientes com Linfoma Cutâneo de Células T (Martínez-Iglesias *et al.*, 2008).

Dentre os efeitos do TSA foram reportados hiperacetilação das histonas, inibição da progressão do ciclo celular e a modificação das histonas nas células tumorais de glândulas mamárias de camundongos. O SAHA, por sua vez, é um inibidor das classes I e II de histonas capaz de inibir células de câncer de próstata em camundongos, sugerindo que essa classe de inibidores pode ser utilizada para o tratamento deste tipo de câncer em humanos (Monneret, 2005).

1.6 Inibidores de Topoisomerases

Durante a pesquisa de novos alvos quimioterápicos, as DNA topoisomerases se destacaram desde sua descoberta. O papel desempenhado por elas na fisiologia celular foi importante para o estudo dessas enzimas como alvo contra processos proliferativos, razão pela qual, elas têm sido utilizadas contra a proliferação de células tumorais, ou

como drogas antiparasitárias promissoras (Balaña-Fouce *et al.*, 2014; Lacombe *et al.*, 2014).

Os inibidores podem ser caracterizados em duas categorias: de classe I e classe II. Os da classe I agem interferindo na capacidade da topoisomerase de clivar e religar a fita de DNA, estabilizando os complexos topoisomerase-DNA. Consequentemente, pode haver morte das células por colisão da forquilha de replicação com o complexo topoisomerase-DNA-inibidor durante a duplicação do DNA. A segunda categoria, de classe II, é de inibidores que interferem com as funções catalíticas das enzimas (Balaña-Fouce *et al.*, 2014).

Dentre os compostos estudados como inibidor de topoisomerases encontramos a camptotecina, que tem como alvo a topoisomerase I. Este composto atua aprisionando a enzima, que é ligada ao DNA, formando um complexo ternário que impede a religação da fita de DNA (Tsao, D'Arpa e Liu, 1992; Balaña-Fouce *et al.*, 2006). Outro composto estudado é o Berenil, que se liga ao sulco menor da fita de DNA e que afeta principalmente a topoisomerase mitocondrial tipo II (Woynarowski *et al.*, 1998; Palchaudhuri, Hergenrother, 2007).

Dentre os efeitos dos compostos citados, observou-se que a camptotecina bloqueia a proliferação, causa supressão do ciclo celular, induz mudanças na ultraestrutura nuclear, apoptose e a redução da atividade mitocondrial de epimastigotas de *T. cruzi* (Zuma *et al.*, 2014). O Berenil por sua vez, apresenta efeitos positivos na diminuição da proliferação e causa a desorganização do kDNA do parasito (Zuma *et al.*, 2011).

II. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é um grave problema de saúde pública, principalmente nas Américas, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas pelo mundo e cerca de 25 milhões em áreas de risco de transmissão dos vetores (Rassi *et al*, 2012; Sacconnay *et al*, 2014; Egüez *et al*, 2017). Mediante a este quadro, apenas dois fármacos são indicados para o tratamento da doença, Benzinidazol e o Nifurtimox, que apresentam efeitos colaterais diversos (Rassi *et al*, 2012). Por essas e outras razões há a necessidade de desenvolvimento de novas terapias mais eficazes e menos tóxicas (Egüez *et al*, 2017).

Com o intuito de obter novos compostos contra *Trypanosoma cruzi*, o projeto em questão tem como objetivo testar novos inibidores cujos alvos são determinadas enzimas presentes no parasito, as histonas desacetilases e as topoisomerasas, que têm se destacado como promissoras em estudos quimioterápicos.

III. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliação dos efeitos de inibidores de histonas desacetilases e de topoisomerasas em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e na viabilidade de células hospedeiras.

3.2 Específicos

- Avaliar os efeitos dos inibidores de histonas desacetilases e topoisomerasas na proliferação do parasita por curvas de crescimento;
- Verificar a viabilidade celular dos parasitas tratados pelo método MTS/PMS;
- Analisar possíveis variações ultraestruturais do parasito por meio de microscopia eletrônica de transmissão;
- Observar alterações na superfície celular dos protozoários pela técnica de microscopia eletrônica de varredura;
- Verificar o efeito dos inibidores de histonas desacetilases e topoisomerasas na viabilidade de células epiteliais de LLC-MK₂ pelo método MTS/PMS.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo Celular

As culturas de epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram mantidas em fase exponencial de crescimento durante 72 horas. As células foram mantidas em garrafa de cultura nas proporções de 10% de suspensão celular, 10% de soro fetal bovino e 80% de meio LIT (Camargo, 1964). As mesmas foram condicionadas em estufa a 28°C. As passagens foram realizadas duas vezes por semana.

As células epiteliais de LLC-MK₂ foram mantidas em meio RPMI, suplementado com 5% de soro fetal bovino, em estufa a 37° C e em uma atmosfera de 5% de CO₂. A cada semana, ou quando a garrafa estava confluenta, foi realizado um novo repique.

4.2. Curvas de Crescimento

A proliferação do parasito foi avaliada na presença de 2 inibidores de Histonas Desacetilases (KV46 e KV24, cedidos em colaboração com o Dr. Franz Bracher – Center of Drug Research, Munique, Alemanha) e 3 inibidores de Topoisomerasas (compostos 3a, 3e e 3f, cedidos em colaboração com o Dr. Parasuraman Jaisankar - Indian Institute of Chemical Biology, Calcutá, Índia).

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas sob diferentes concentrações dos compostos acima citados. Estas foram mantidas em tubos falcon na concentração inicial de 1×10^6 células, em um volume de 2 ml por tubo. Após 24 horas de crescimento, foi adicionada a droga em diferentes concentrações. Um grupo não tratado também foi mantido nas mesmas condições.

Os compostos utilizados foram estocados a 5 e 10 mM em DMSO e foram testados em concentrações que variaram de 1 a 50 µM.

Após 72 horas de crescimento, foi calculada a concentração mínima inibitória dos compostos (IC₅₀).

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, a cada 24 horas, com auxílio do microscópio óptico, considerando as células fixadas presentes nos quatro quadrantes da mesma. A partir dos resultados foram montados os gráficos de curva de crescimento.

4.3 Viabilidade Celular

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular, os parasitas foram avaliados pelo método MTS/PMS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]; metossulfato de fenazina). O reagente PMS é reduzido nas células viáveis e seus elétrons transferidos para o MTS, que pela ação das enzimas desidrogenases, são convertidos à formazan, na proporção do número de células viáveis (Henriques *et al.*, 2011).

Dessa forma, tubos falcon contendo epimastigotas de *T. cruzi* foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 1 mililitro de meio de eletroporação (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM NaH₂PO₄, 6 mM glucose, pH 7.4).

O ensaio foi realizado em uma placa transparente de 96 poços. Para cada amostra foram usados quatro poços contendo 100 µl da suspensão celular cada, sendo dois deles duplicata sem formaldeído e os outros dois contendo formaldeído a 4% (controle positivo de morte).

Na sequência, foram adicionados 4 µl da solução de formaldeído nos poços referentes ao controle de morte. Vinte microlitros da solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS) e metossulfato de fenazina (PMS) foram transferidos para cada poço de cada amostra. A placa foi incubada por 4 horas, em ausência de luz, a 28°C. A leitura foi realizada no leitor de placas Molecular Devices Microplate Reader (Spectra Max Molecular Devices M2e) a 490 nm.

Para verificar a viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂ após o tratamento com os diferentes inibidores, o meio de cultura foi retirado, ficando apenas as células aderidas ao fundo dos poços. Em seguida, 100 µl de tampão de eletroporação foram

inseridos nos poços. Na sequência, o mesmo protocolo descrito no parágrafo acima foi utilizado, com exceção da temperatura de incubação (que foi de 37°C).

Os valores da concentração mínima inibitória dos compostos, nas culturas de LLC-MK₂ (CC₅₀), foi obtido após 96 horas de tratamento.

4.4 Microscopia Eletrônica De Transmissão

Para avaliar as variações ultraestruturais do parasito, foi realizada a fixação das amostras com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pH 7,4; por uma hora à temperatura ambiente. As células foram pós-fixadas com uma solução de 1:1 de tetróxido de ósmio (Os₂O₄ 1%) e ferrocianeto de potássio [K₄Fe(CN) 1,25%] por uma hora, sem exposição à luz, à temperatura ambiente.

Para as etapas de desidratação, foram adicionadas acetona 50% e acetona 70%, respectivamente, com um intervalo de 10 minutos cada. Após esta etapa, os pellets foram transferidos para vidros de inclusão, onde foi adicionada acetona 90% por um período de 10 minutos. Descartada a acetona 90%, foi adicionada por duas vezes no intervalo de 10 minutos a acetona 100%.

Para a etapa de infiltração, foi adicionada uma solução de 1:1 de acetona 100% e resina Epon em cada amostra, overnight e à temperatura ambiente. No dia seguinte, foi retirada a solução de acetona-resina e acrescentado o Epon 100% em cada amostra por 5 horas.

Após o período determinado, as amostras foram emblocadas, em formas de silicone, e acondicionadas em uma estufa própria a 60°C, por 72 horas. Após emblocado, o material foi trimado e levado para o ultramicrotomo, onde foram realizados cortes ultrafinos (de 70 nm de espessura aproximadamente) no material.

As grades contendo os cortes foram contrastadas com acetato de uranila (5%) por 40 minutos e em citrato de chumbo por 5 minutos, e observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900 e Jeol 1200.

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o intuito de observar a superfície celular dos protozoários, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas como descrito anteriormente. Após o período determinado, os parasitas foram lavados em cacodilato 0,1M e aderidos à lamínula previamente revestida com 15 µL de Poli-L-lisina por 10 minutos. As lamínulas foram transferidas, então, para uma placa de 24 poços e pós-fixadas com tetróxido de ósmio (Os_2O_4 1%) e ferrocianeto de potássio [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})$ 1,25%] em uma proporção de 1:1 por 30 minutos. As lamínulas foram lavadas em tampão cacodilato e as amostras desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com etanol 100%), por 10 minutos cada. Após o processo, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico de CO_2 .

As amostras foram aderidas a suportes apropriados, chamados stubs, metalizadas com uma fina camada de ouro, e observadas ao microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

4.6 Estatística

A estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 7. Uma ANOVA com duas vias e teste comparativo Bonferoni foram realizados.

V. Resultados

5. 1. Efeito dos Inibidores de Histonas Desacetilases e Topoisomerases Sobre a Proliferação Celular

Como anteriormente descrito, os inibidores de histonas desacetilases (HDACi) atuam sobre a condensação da cromatina. Logo, os fatores de regulação gênica, responsáveis pela tradução, replicação e reparo do DNA são afetados. Diante disso, para se averiguar a proliferação parasitária, ensaios com os compostos KV46 e KV24 foram realizados nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M, por até 96 horas de crescimento.

A análise das curvas de crescimento demonstrou que ambos os compostos foram capazes de induzir a redução da proliferação nas maiores concentrações, 10 e 50 μ M, após 72 horas de tratamento (Figuras 6 e 7). As demais concentrações (1 e 5 μ M), em contrapartida, não tiveram uma atuação proporcional em inibir a proliferação do parasito. O valor de IC₅₀ dos inibidores foi calculado após 72 horas de tratamento, sendo o do KV46 de 11 μ M e do KV24, 7 μ M (tabela 1).

Os inibidores de topoisomerases, por sua vez, agem em enzimas atuantes no superenovelamento das fitas do DNA. Assim como os HDACi, estes compostos podem dificultar o acesso da polimerase, de fatores transcricionais e de proteínas de reparo ao DNA. Visto isso, igualmente foram realizados ensaios para avaliar a proliferação das formas epimastigotas do *T. cruzi* com os compostos 3a, 3e e 3f. As curvas foram realizadas no intervalo de 96 horas, nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 20 μ M, sendo os compostos adicionados no tempo 24 horas de crescimento.

T. cruzi Y com KV46

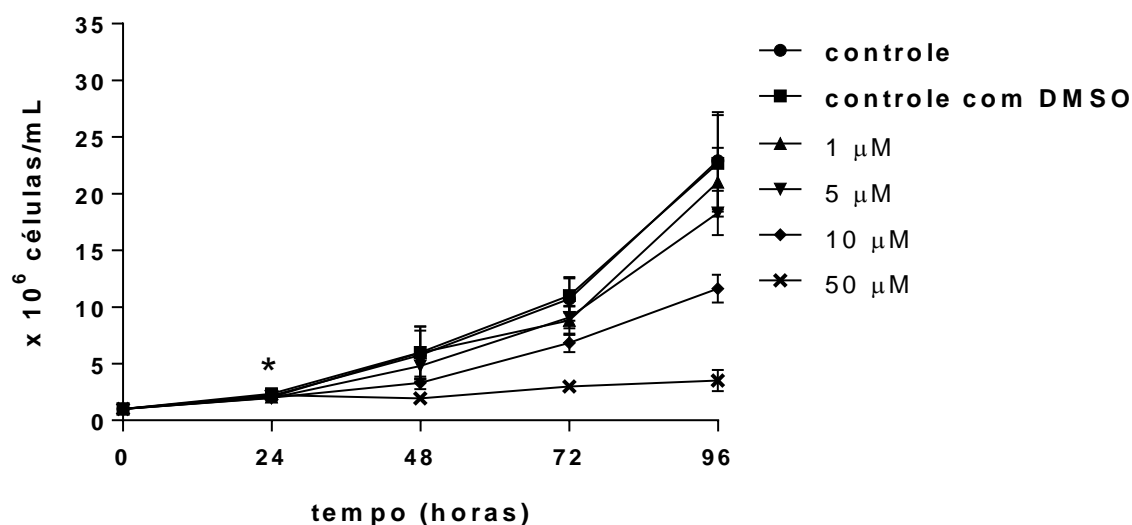


Figura 6: Proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com KV46. O asterisco representa o momento da adição da droga no meio de cultura. Os resultados da curva de crescimento demonstram que o composto KV46 foi mais eficaz ao inibir a proliferação celular do *T. cruzi*, nas maiores doses de crescimento, de 10 e 50 μ M.

T. cruzi Y com KV24

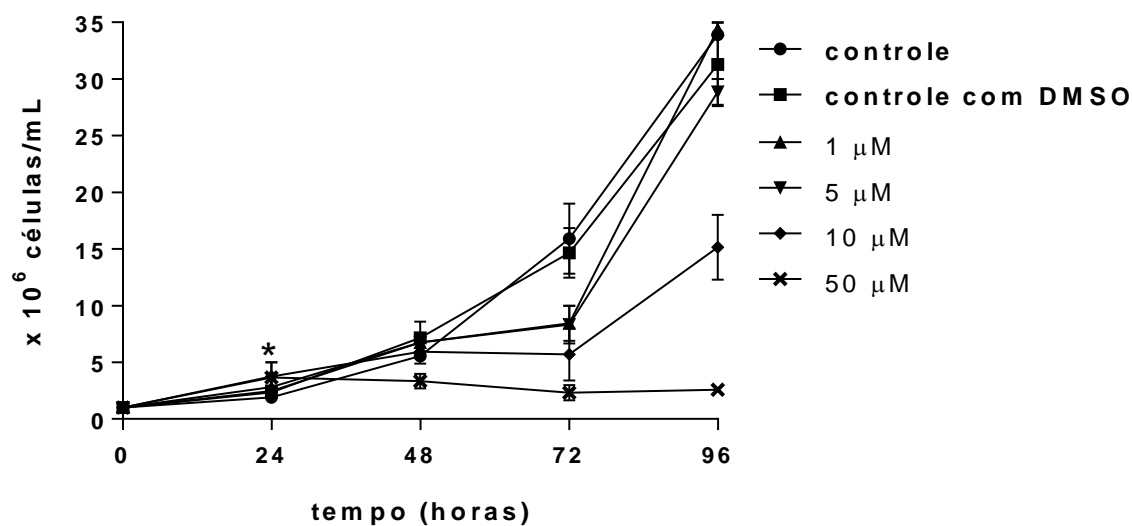


Figura 7: Proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com KV24. O asterisco representa o momento da adição da droga no meio de cultura. Os resultados da curva de crescimento demonstram que o composto KV24 foi eficaz ao inibir a proliferação celular do *T. cruzi*, nas maiores concentrações da droga, de 10 e 50 μ M.

A partir dos resultados obtidos, podemos inferir que, de maneira geral, os três compostos foram capazes de inibir a proliferação dos parasitos, sendo as maiores doses, 10 μ M e 20 μ M, responsáveis pelos maiores índices de inibição.

O composto 3a, em relação aos demais, causou um menor efeito antiproliferativo, mesmo quando usado nas maiores concentrações. No que diz respeito à menor concentração testada (1 μ M), consideramos que pode ter havido pouca ou nenhuma inibição da proliferação (Figura 8). A partir dos dados obtidos, o IC₅₀ deste inibidor foi de 13 μ M após 72 horas de tratamento (tabela 1).

O composto 3e causou uma considerável inibição da proliferação dos parasitos quando a concentração de 10 μ M foi usada (Figura 9), sendo por isso, mais eficaz que a droga 3a. Este resultado pode ser visto também a partir do valor de IC₅₀ deste composto que foi de 10 μ M após 72 horas de tratamento (tabela 1).

Já o inibidor 3f foi aquele que levou à maior inibição da proliferação celular, visto que com 10 μ M e após 72 horas de tratamento, o número de parasitas tratados foi bem menor do que no grupo controle (Figura 10). Após 72 horas na presença da droga, o IC₅₀ foi de 4 μ M (tabela 1).

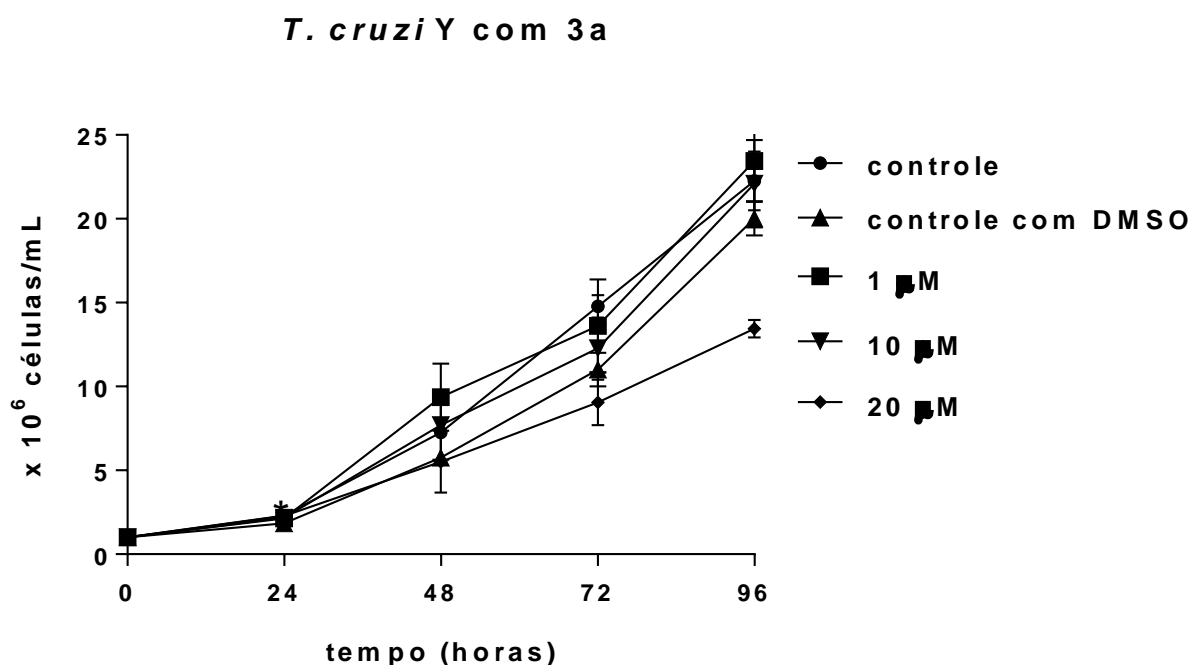


Fig. 8: Proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com 3a. O asterisco representa o momento da adição da droga no meio de cultura. Os resultados da curva de crescimento demonstram que o composto 3a diminuiu a proliferação celular do *T. cruzi* na maior concentração, da droga, 20 μ M.

T. cruzi Y com 3e

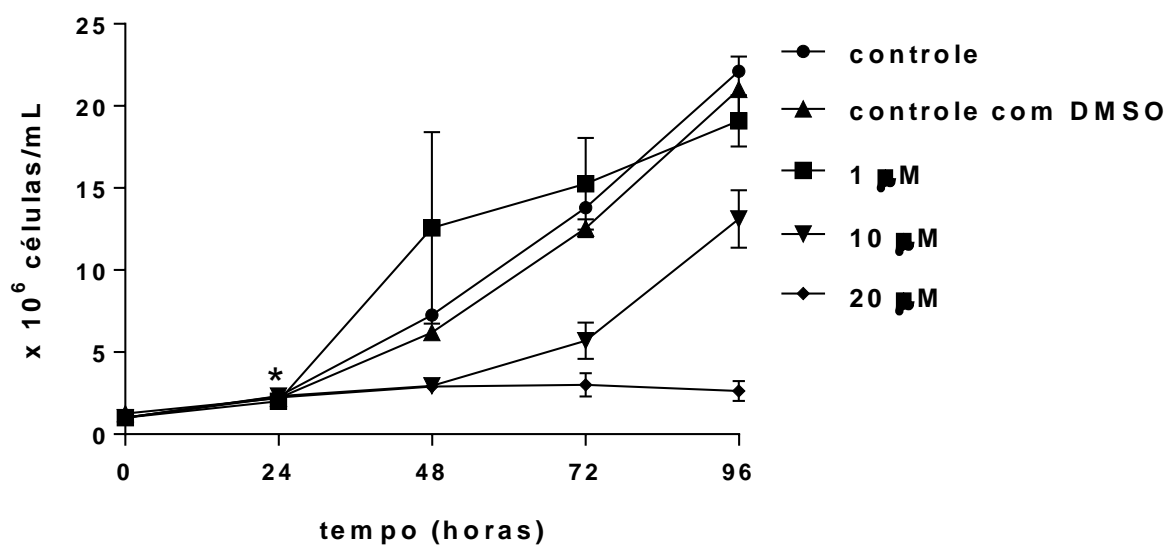


Fig. 9: Proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com 3e. O asterisco representa o momento da adição da droga no meio de cultura. Os resultados da curva de crescimento demonstram que o composto 3e reduziu a proliferação celular de *T. cruzi* nas maiores concentrações da droga, 10 e 20 μ M.

T. cruzi Y com 3f

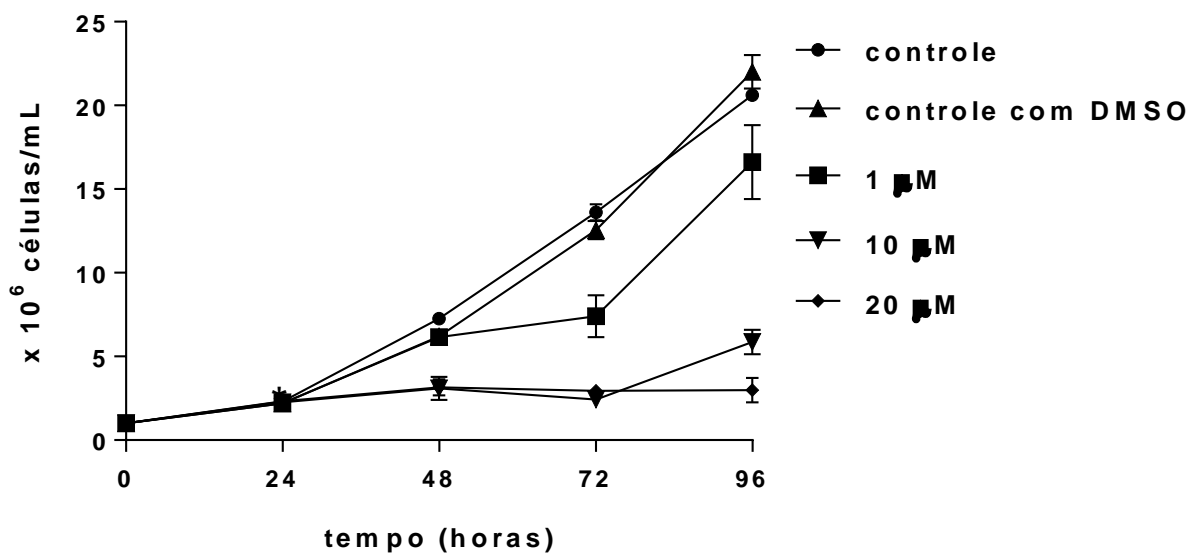


Fig. 10: Proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com 3f. O asterisco representa o momento da adição da droga no meio de cultura. Os resultados da curva de crescimento demonstram que o composto 3f reduziu consideravelmente a proliferação celular de *T. cruzi*, nas maiores concentrações da droga, 10 e 20 μ M.

5. 2. Efeito dos Inibidores na Viabilidade Celular

Após ser avaliada a proliferação dos parasitos, foram realizados testes para avaliar a viabilidade celular das formas epimastigota do *T. cruzi*. Bem como nas curvas de crescimento, os ensaios foram realizados utilizando-se as mesmas concentrações dos inibidores de histonas desacetilases (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) e topoisomerases (1 μ M, 10 μ M e 20 μ M).

Observamos que apenas a maior concentração dos inibidores de histonas desacetilases, 50 μ M, foi capaz de reduzir significativamente o percentual de células viáveis, em todos os tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas)(Figuras 11 e 12). Isto gerou uma redução de cerca de 80% de células viáveis pela KV46, e 88% pela KV24 em 72 horas de tratamento.

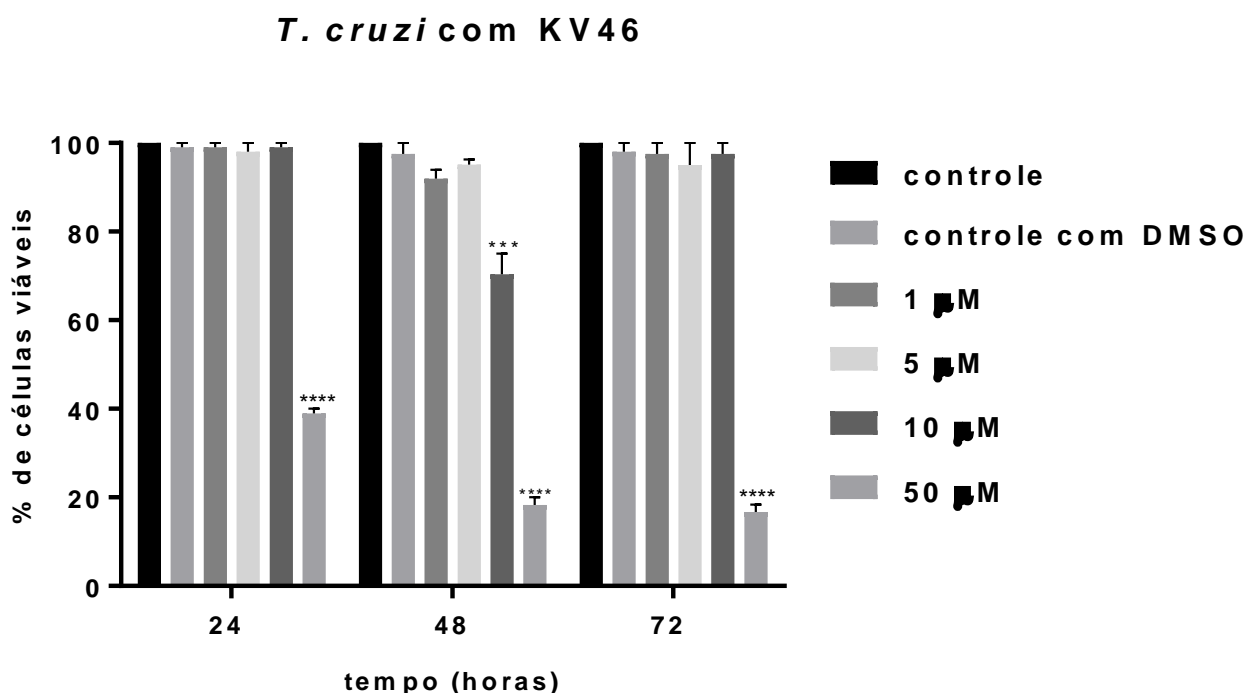


Figura 11: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*, após 24 horas de tratamento com KV46. O percentual de células viáveis foi reduzido em 82% após 24 horas de tratamento com a maior dose testada, de 50 μ M. Quatro experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: **p* 0.0117; ****p* 0.0007; *****p* < 0.0001.

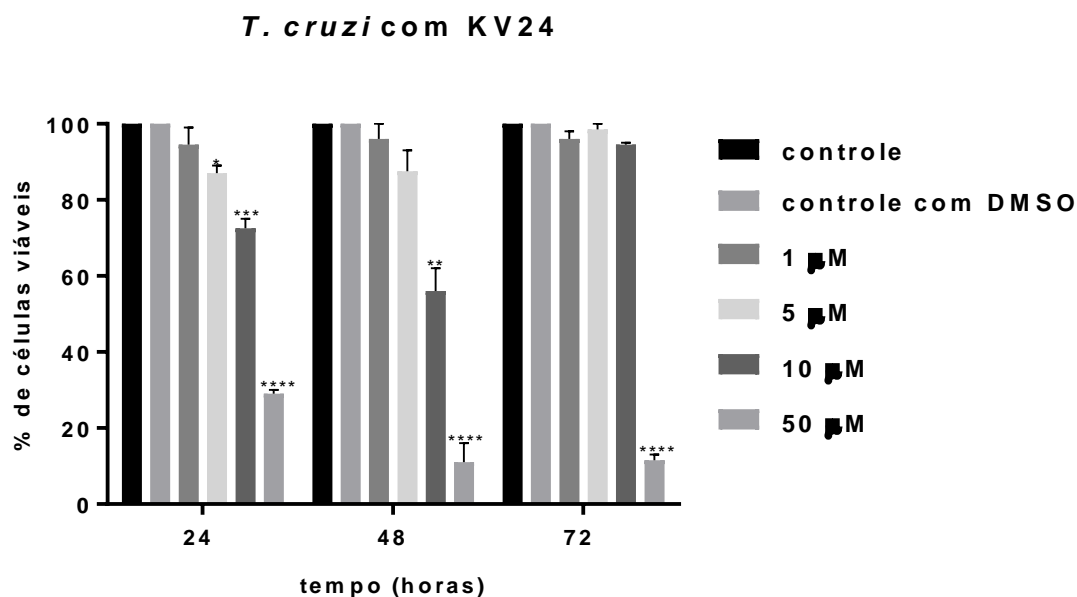


Figura 12: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*, após 24 horas de tratamento com KV24. O percentual de células viáveis foi reduzido significativamente em 88% após 72 horas de tratamento com a maior dose testada, de 50 µM. Dois experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: **p* 0.0351; ***p* 0.0016; ****p* 0.0007 *****p* < 0.0001.

Já os inibidores de topoisomerasas, apresentaram um melhor resultado nas maiores concentrações, 10 µM e 20 µM, testados após 24, 48 e 72 horas de tratamento. O composto 3a não apresentou níveis significativos de redução da proliferação, resultando em um percentual de 95% de células viáveis no tempo de 72 horas. Já os compostos 3e e 3f levaram ao menor percentual de células viáveis, que foi de 10% e 13%, respectivamente, nas maiores doses testadas (Figuras 13, 14 e 15).

T. cruzi com 3a

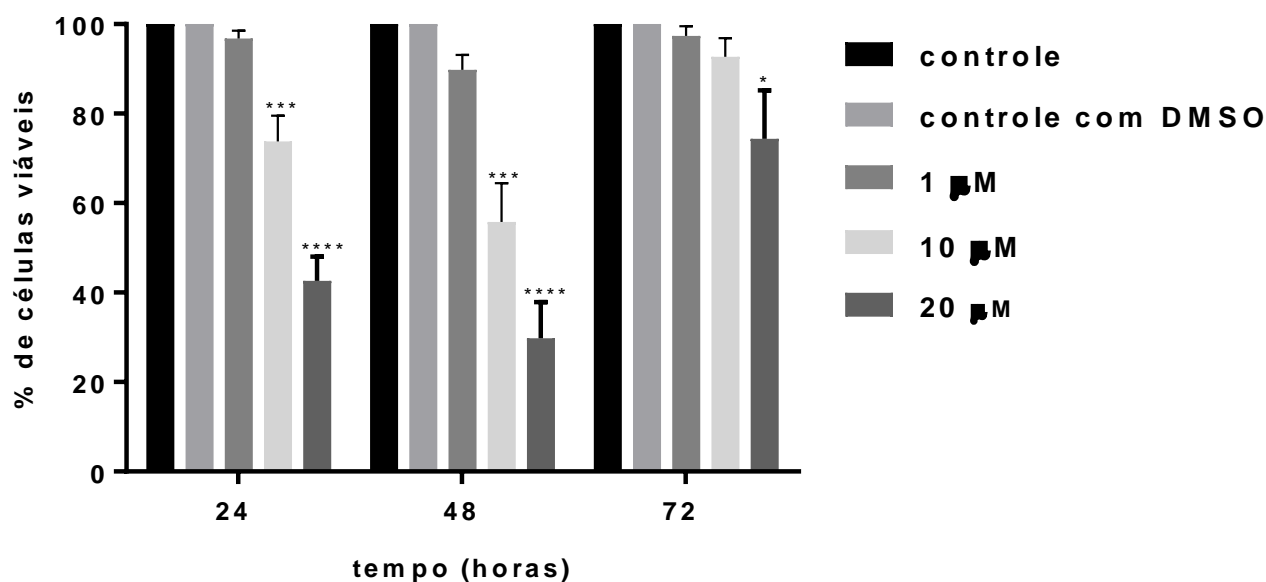


Fig. 13: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com 3a. Nota-se maior redução do percentual de células viáveis com a maior dose testada, de 20 µM. Quatro experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: **p* 0.0263;****p* 0.0002 *****p* < 0.0001.

T. cruzi com 3e

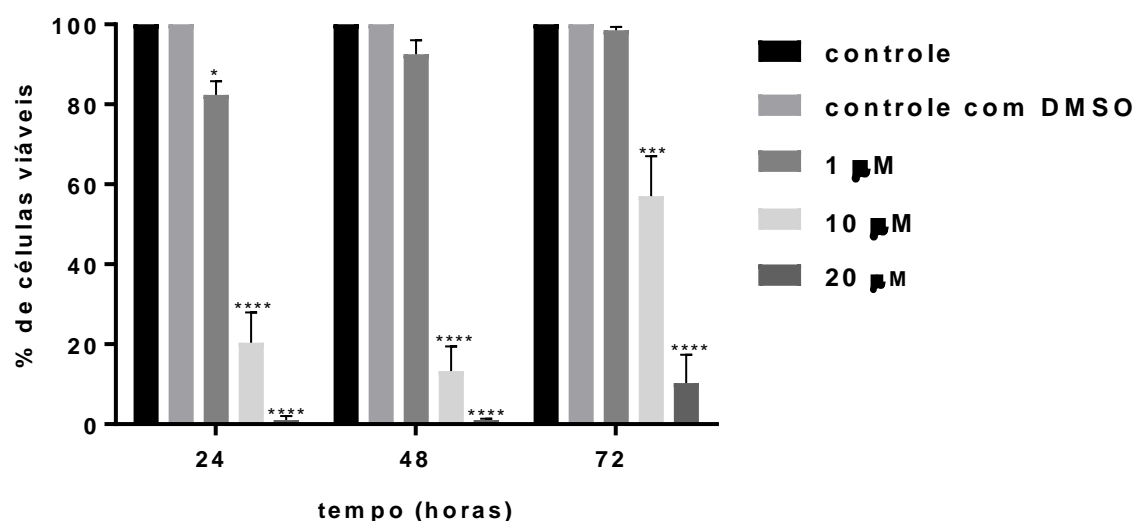


Fig. 14: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com 3e. O percentual de células viáveis foi reduzido significativamente após 72 horas de tratamento nas maiores doses testadas, de 10 e 20 µM. Quatro experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: **p* 0.0130;****p* 0.0002 *****p* < 0.0001.

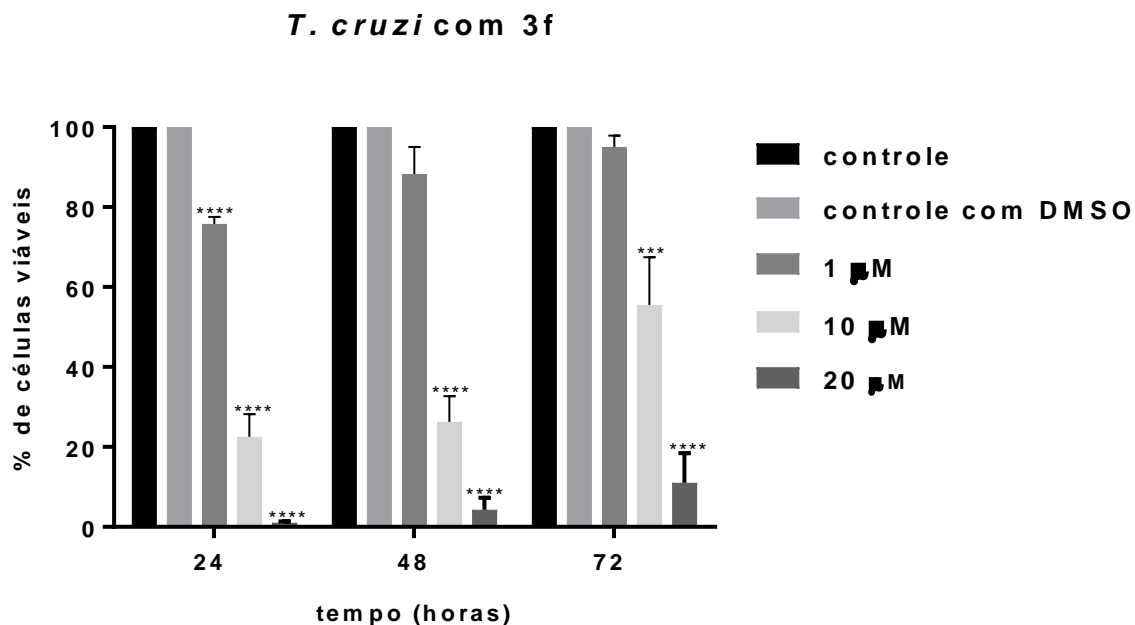


Fig. 15: Viabilidade celular das formas epimastigotas do *T. cruzi*, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com 3f. O percentual de células viáveis foi reduzido significativamente após 72 horas de tratamento com as maiores doses testadas, de 10 e 20 µM. Quatro experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: ****p* 0.0008; *****p* < 0.0001.

5. 3. Efeito dos Inibidores de Sobre a Viabilidade Celular das culturas de LLC-MK₂

Após se averiguar o efeito dos compostos na viabilidade celular das formas epimastigotas do *T. cruzi*, iniciamos a avaliação em culturas de LLC-MK₂ após 96 horas de tratamento. Para isso, as mesmas concentrações dos compostos foram utilizadas.

O composto KV46 causou uma redução do percentual de células viáveis de cerca de 28%, nas duas maiores concentrações, 10 e 50 µM, sendo o seu CC₅₀ maior que 50 µM (tabela 1). Já a KV24 levou a uma redução de 67% na sua maior concentração, de 50 µM, apresentando CC₅₀ de 20 µM (Figuras 16 e 17).

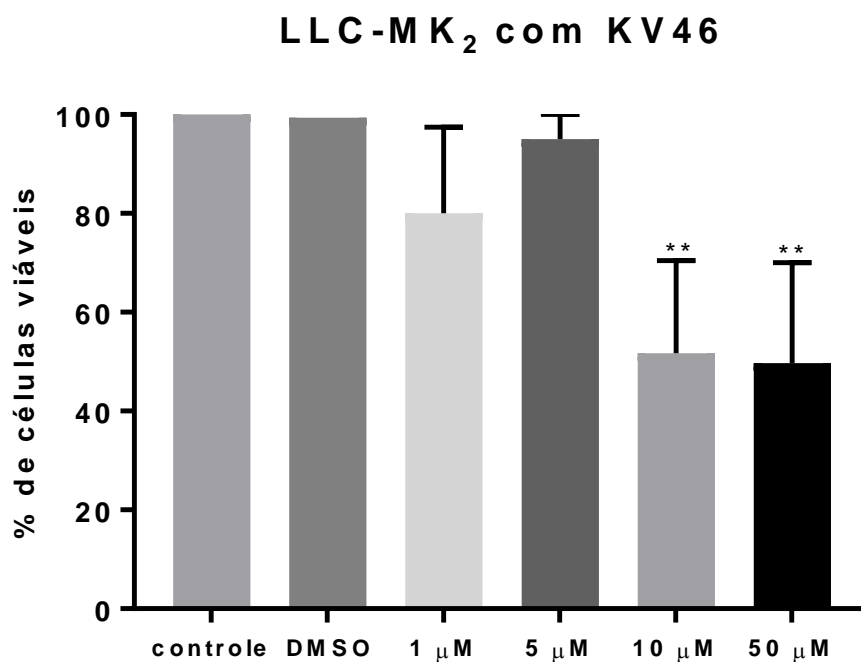


Figura 16: Viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂, após 96 horas de tratamento com KV46. Diminuição de quase 30% do percentual de células viáveis nas maiores concentrações testadas (10 e 50 μM). Dois experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: ***p* 0.0045 (10 μM) ***p* 0.0035 (50 μM).

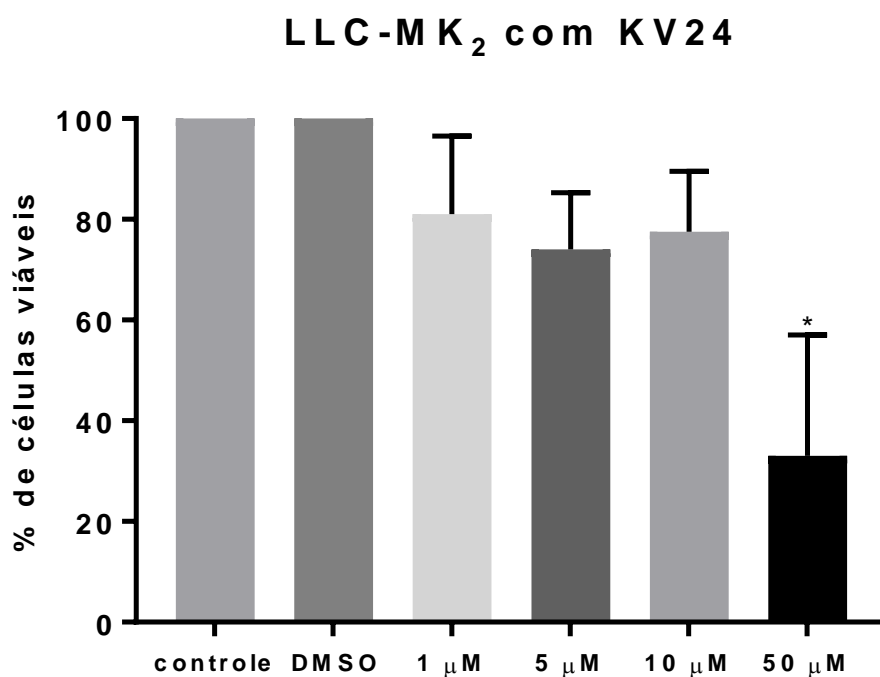


Fig. 17: Viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂, após 96 horas de tratamento com KV24. Diminuição de quase 70% do percentual de células viáveis na maior concentração testada (50 μM). Dois experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão. O asterisco significa o *p* valor: **p* 0.0127.

Os inibidores de topoisomerases apresentaram menos efeitos tóxicos nas células de LLC-MK₂. Dentre os compostos, o 3a não causou nenhuma toxicidade nas células, que estavam 100% viáveis nas três concentrações testadas. Já o composto 3e levou a um percentual de células viáveis de 91 e 70% nas duas maiores concentrações testadas, 10 e 20 µM, respectivamente. Enquanto que as culturas tratadas com as maiores concentrações do composto 3f apresentaram cerca de 80% de células viáveis.

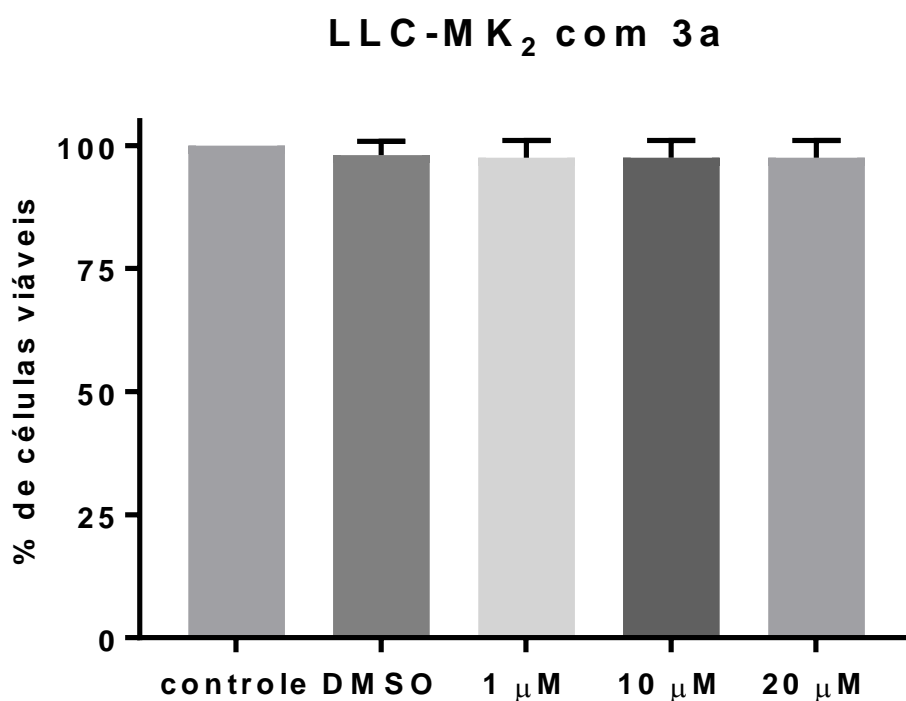


Figura 18: Viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂, após 96 horas de tratamento com 3a. Não houve redução nos percentuais de viabilidade em nenhuma das concentrações testadas. Dois experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão.

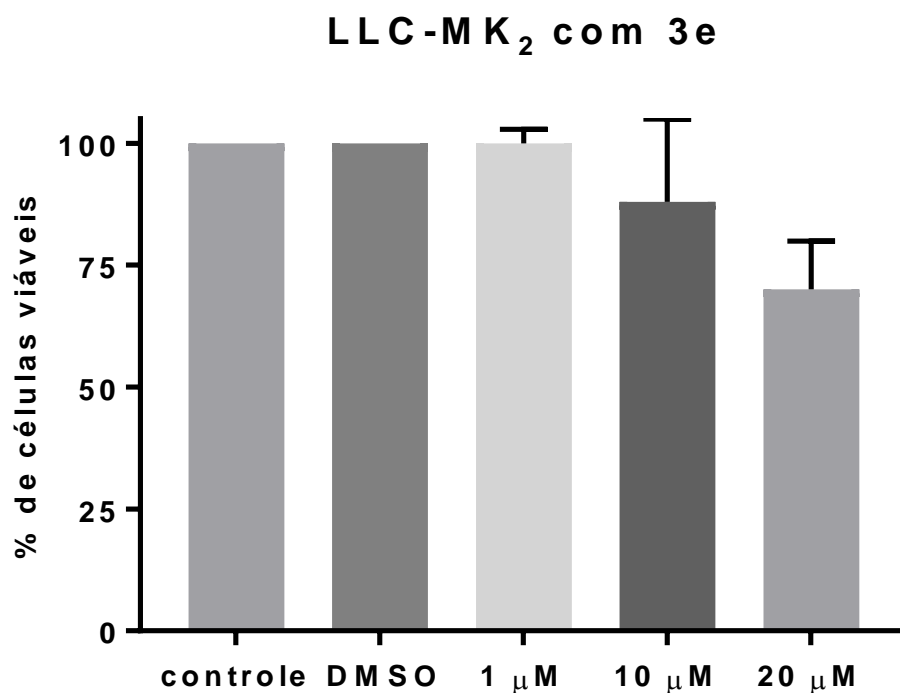


Figura 19: Viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂ após 96 horas de tratamento com 3e. Nota-se cerca de 91 e 70% de células viáveis nas duas maiores concentrações testadas, 10 e 20 μ M, respectivamente. Dois experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão.

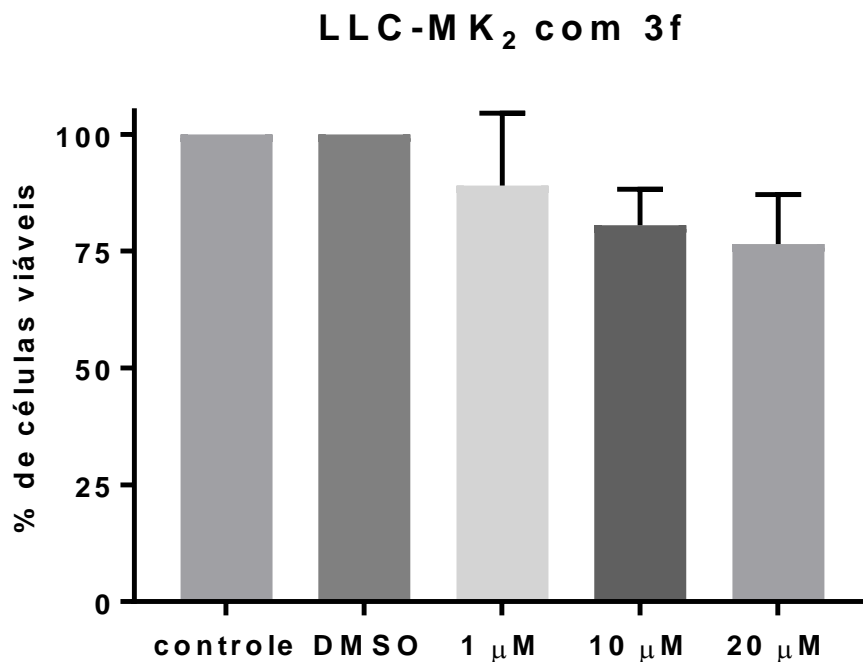


Figura 20: Viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂ após 96 horas de tratamento com 3f. Cerca de 81 e 76% de células estavam viáveis nas maiores concentrações, 10 e 20 μ M, respectivamente. Dois experimentos independentes foram realizados. Cada barra representa o desvio padrão.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (após 72 horas de tratamento) e de CC₅₀ (após 96 horas na presença dos inibidores).

Composto	Classe	IC ₅₀ em <i>T. cruzi</i> (epimastigota)	CC ₅₀ em LLC-MK ₂
KV46	Inibidor de HDAC	11 µM	> 50 µM
KV24		7 µM	20 µM
3a	Inibidor de topoisomerase	13 µM	> 20 µM
3e		10 µM	> 20 µM
3f		4 µM	> 20 µM

5. 4. Efeitos dos Inibidores na Ultraestrutura e Morfologia Celular

A fim de avaliar os efeitos dos inibidores na ultraestrutura celular, as amostras foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

As amostras tratadas com 5 e 10 µM da KV46 foram processadas no tempo de 24 horas. Nos parasitos não tratados pudemos observar a cromatina condensada ao redor do núcleo, o kDNA em seu formato característico de bastão, além da morfologia característica, fusiforme, das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 21 - A e E).

Nas amostras tratadas com 5 μM , observamos parasitas com inchaço mitocondrial (Figura 21 - B). Nos parasitas tratados com 10 μM , pôde-se observar uma área mais eletrondensa na região próxima ao axonema, sugerindo uma alteração na região paraflagelar, o que poderia estar diretamente relacionada com a motilidade do parasito (Figura 21 – C e D). O processamento para varredura, por sua vez, foi realizado no tempo de 48 horas de tratamento a 10 μM . Nas observações ao microscópio, pudemos notar majoritariamente torções no corpo celular (Figura 21- F).

As amostras da KV24 foram processadas para microscopia de transmissão, a 10 μM no tempo de 72 horas de tratamento. O efeito deste composto sobre os epimastigotas foi uma aparente diminuição no tamanho do kDNA (Figura 22 - A e B), que está localizado no cinetoplasto e possui normalmente formato característico de bastão (Figura 21 - A). O processamento para varredura também foi realizado a 10 μM , após 48 horas de tratamento. Observamos o achatamento e o tamanho reduzido do corpo celular, em comparação aos parasitos não tratados, que apresentam formato fusiforme característico (Figura 22 - C).

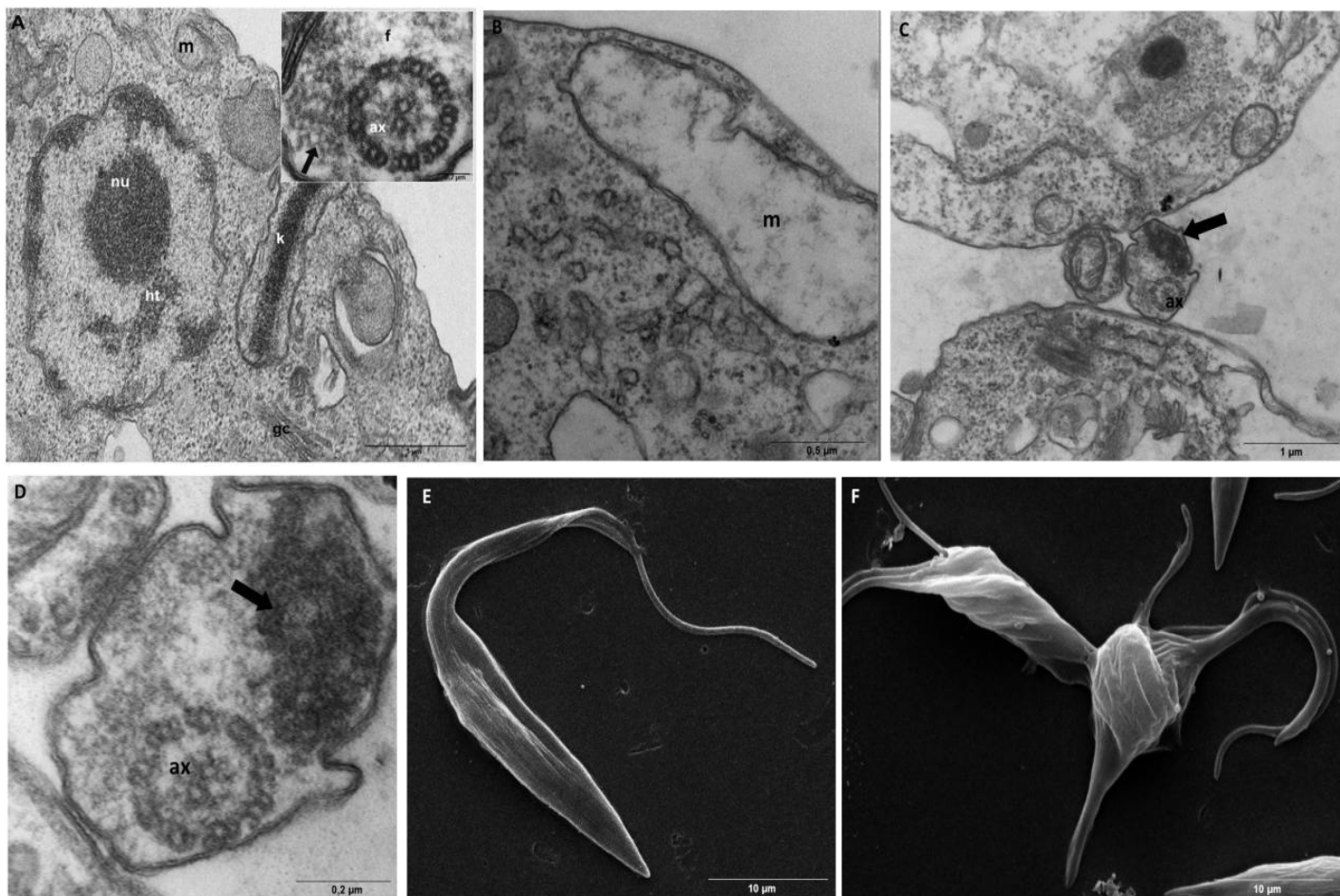


Figura 21: Forma epimastigota de *T. cruzi* tratado com o composto KV46. (A) Microscopia eletrônica de transmissão de *T. cruzi* controle. Pode ser observado o núcleo com a heterocromatina (ht) condensada ao redor do núcleo (nu), e justaposta ao envelope nuclear; próximo ao núcleo está o kDNA (k). Ainda na imagem é possível observar a região do axonema (ax) e a região paraflagelar (seta) na região do flagelo (f). (B) Parasitas tratados com 5 µM por 24h, apresentando inchaço mitocondrial (m). (C e D) Tratamento com 10 µM por 24h. Parasitas apresentaram uma região eletrondensa atípica (seta), próxima ao axonema (ax), que pode estar relacionada a uma desorganização da região paraflagelar. (E) Microscopia eletrônica de varredura do controle da forma epimastigota de *T. cruzi*. (F) Parasitos tratados com 10 µM por 48h apresentando torções no corpo celular.

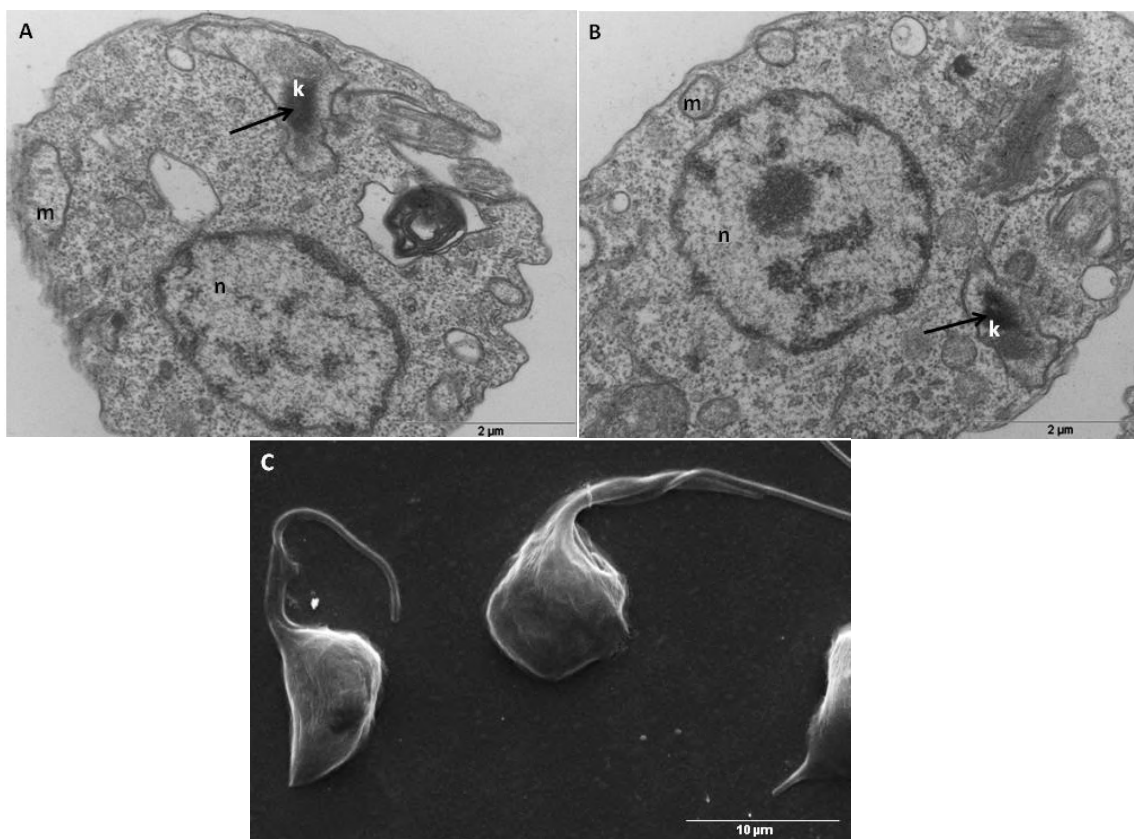


Figura 22: Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com o composto KV24. (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos tratados com 10 µM por 72h. Os parasitos apresentaram uma aparente redução do tamanho do seu kDNA (seta). (C) Microscopia eletrônica de varredura de *T. cruzi* tratado com 10 µM por 48h. Os parasitos apresentaram uma morfologia mais arredonda e tamanho reduzido, em relação ao controle (Fig 21. E).

Os parasitos tratados com os inibidores de topoisomerases foram processados para microscopia eletrônica de transmissão e varredura após 24 horas de tratamento, sendo o composto 3a processado a 20 µM, e os compostos 3e e 3f a 10 µM.

Observamos que o composto 3a não promoveu alterações significativas em organelas de *T. cruzi*, porém, os parasitos tratados apresentaram certa alteração na superfície celular, que se mostrou um pouco retorcida (Figura 23 - A e B). O composto 3e, por sua vez, causou acúmulos de corpos lipídicos, além de torção do corpo celular (Figura 23 - C-D). Um achado importante nos tratados com o composto 3f foi a desorganização do complexo de Golgi (Figura 23 - E). Além disso, foram observados parasitas predominantemente achatados e arredondados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 23 - F).

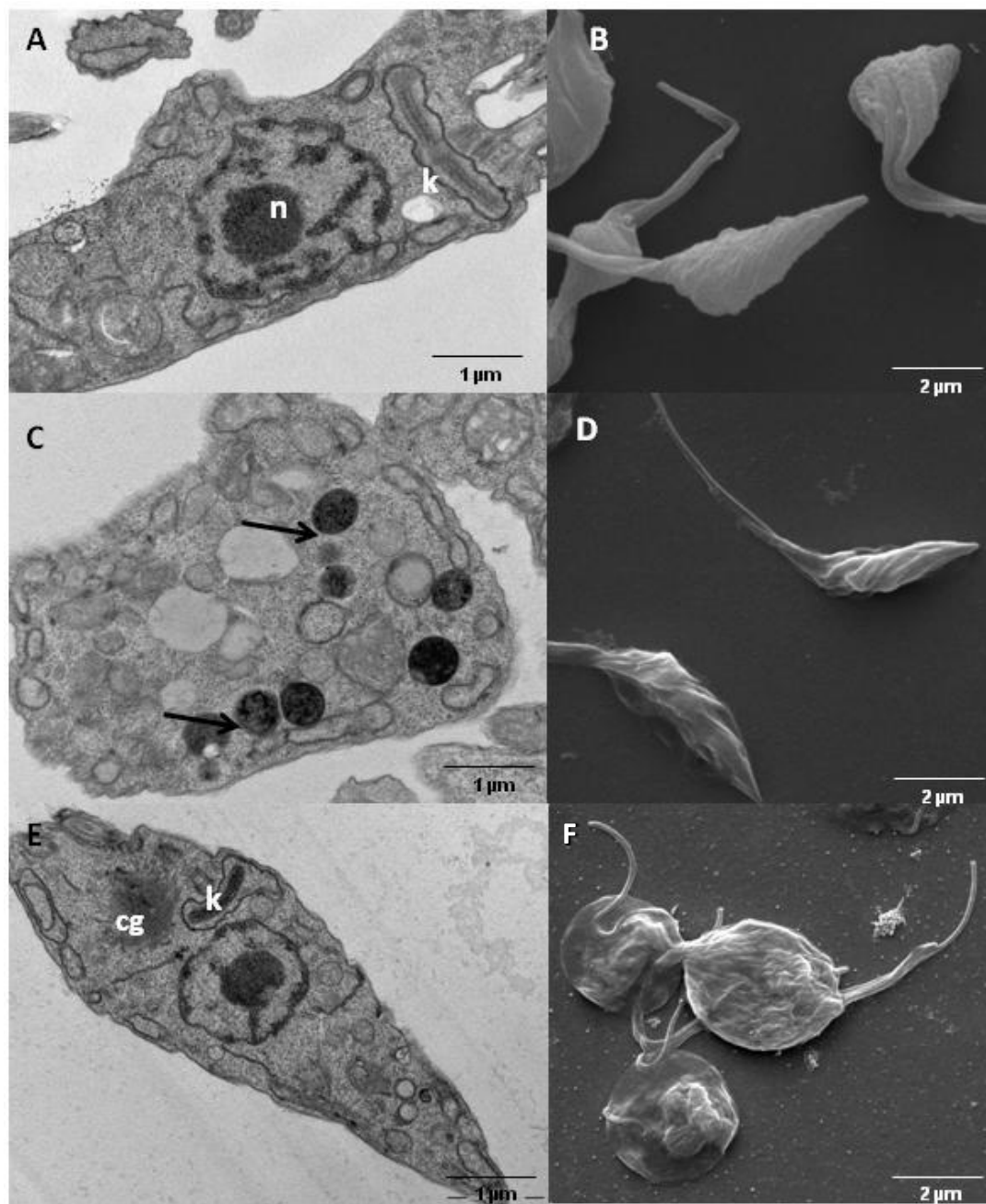


Figura 23: Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com os inibidores de topoisomerasas. (A e B) *T. cruzi* tratado com 20 μM por 24 horas pelo composto 3a. As organelas dos parasitos permaneceram conservadas, mas o corpo celular estava retorcido. (C e D) Tratamento com 10 μM por 24 horas do composto 3e. Notar os vários corpos lipídicos (setas) presentes no citosol e a torção no corpo celular. (E e F) Parasitos tratados com 10 μM por 24h pelo inibidor 3f. Estes apresentaram desorganização do complexo Golgi (cg) e morfologia mais achatada e arredondada.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram, portanto, a efetividade destes inibidores em inibir a proliferação e a viabilidade celular dos parasitos, ao mesmo tempo que causaram baixa toxicidade em células de mamífero. Além disto, foram observadas alterações significantes na ultraestrutura e morfologia dos parasitos, que podem ter relação com os demais efeitos reportados.

VI. DISCUSSÃO

A doença de Chagas ou como também é conhecida, tripanossomíase Americana, é dita como uma das treze doenças negligenciadas do mundo pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Descoberta em 1909, a doença de Chagas foi e continua a ser um importante problema econômico e social para muitos países latino-americanos (Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas e mais de 28 milhões em risco de contrair a doença. No Brasil, estima-se que o número de infectados seja de cerca de 2 a 3 milhões (Dias, Borges-Pereira e Macedo, 2013; Mello *et al.*, 2017). Apenas dois fármacos, descobertos no final da década de 1960 e o início de 1970, têm sido utilizados para o tratamento da doença. São eles o nifurtimox e benznidazol, mais eficazes na fase aguda, porém são responsáveis por causar efeitos colaterais diversos em cerca de 40% dos pacientes. Dessa forma, a busca por novas terapias mais eficazes e menos tóxicas é necessária (Morilla e Romero, 2015; Egüez *et al.*, 2017; Mello *et al.*, 2017).

Além do fator toxicidade, tem sido reportada resistência a drogas pelo *T. cruzi*. Uma variedade de cepas do grupo II de *Trypanosoma cruzi*, predominantes no ciclo doméstico e relacionadas com a transmissão da doença em humanos, têm se mostrado resistente às drogas amplamente utilizadas para o tratamento. Foi demonstrado ainda que as cepas VL-10 e Colombiana (grupo III) também apresentaram resistência ao azol D0870, e o tratamento por irradiação também resultou em resistência ao análogo de purina tuberculina, relacionada a defeitos no transporte da tuberculina (Andrade *et al.*, 1985; Buckner *et al.*, 1998; Zingales, 2011; Rassi *et al.*, 2010).

Em vista disto, uma estratégia para a busca de novos compostos antiparasitários é o estudo de inibidores de histonas desacetilases (HDACi). As histonas são pequenas proteínas básicas ricas em lisina e arginina. Elas podem ser acetiladas e desacetiladas, sendo as histonas desacetilases (HDACs) responsáveis por este último evento. A desacetilação, por sua vez, irá induzir uma repressão transcricional em função da condensação da cromatina (Monneret, 2005; Melesina, J *et al.*, 2015). Outro grupo estudado como alvo de drogas são as topoisomerases (Topo), importantes na fisiologia celular, principalmente nos processos proliferativos. Sua participação está relacionada diretamente com a organização compactada e negativamente superenrolada que o DNA

assume. Portanto, as Topo são proteínas responsáveis por relaxar o superenovelamento do DNA por meio de quebras em uma ou nas duas fitas da dupla hélice (Balaña-Fouce *et al.*, 2014). Sendo assim, ambas as proteínas (histonas desacetilases e topoisomerases) são importantes para a manutenção dos tripanossomatídeos, permitindo o acesso de fatores transcricionais ao DNA.

O presente estudo teve a finalidade de investigar os possíveis efeitos de novos compostos inibidores de histonas desacetilases e topoisomerase nas formas epimastigota do *T. cruzi* e na viabilidade de suas células hospedeiras.

Estudos com os HDACi têm demonstrado efeitos na proliferação, diferenciação, além de indução de morte por apoptose em *Schistosoma* e *Leishmania* testados (Azzi, Cosseau e Grunau, 2009; Hailu *et al.*, 2017). Em um estudo realizado com um novo inibidor de HDAC, KH-TFMDI, foi observada a inibição da proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* em concentrações muito baixas, com valor de IC₅₀ de 7±0.51 µM (Veiga-Santos *et al.*, 2014). Nossos resultados acerca da proliferação celular demonstraram que os compostos testados foram capazes de inibir a mesma. Porém, diferentemente do encontrado no experimento reportado por Veiga-Santos e colaboradores (2014), a inibição ocorreu somente nas maiores doses testadas (10 e 50 µM). Em 50 µM observamos um padrão de inibição ao longo das 96 horas de crescimento, sendo os valores de IC₅₀ em torno de 11 e 7 µM para os compostos KV46 e KV24, respectivamente. O mesmo padrão de inibição do crescimento foi observado em um experimento utilizando o mesmo composto, KH-TFMDI, nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, também nas maiores concentrações testadas, 4 e 5 µM (Verçosa *et al.*, 2017). Em relação à viabilidade celular dos parasitos, tivemos cerca de 82% de redução da viabilidade pela KV46 na maior concentração testada, o que também foi demonstrado após o tratamento com a droga KV24. Em um experimento realizado com a salermida também foi possível observar uma diminuição da viabilidade das formas epimastigota de *T. cruzi* na maior dose testada, de 100 µM (Moretti *et al.*, 2015). Notamos então que os compostos inibidores de HDACs têm atuação significativa na proliferação e viabilidade dos epimastigotas de *T. cruzi*.

Nos testes realizados em células de mamífero (LLC-MK₂), observamos que a KV46 reduziu em menos de 50% o número de células viáveis após o uso das duas maiores concentrações testadas, 10 e 50 µM. Diferentemente, a droga

KV24 reduziu em mais de 50% o percentual de células viáveis na maior concentração testada, 50 μ M. Certa citotoxicidade em células humanas foi também demonstrada em testes realizados com *T. brucei brucei* tratados com HDACi, mesmo em concentrações micromolares, com valor de CC₅₀ de na maior dose testada (Hailu *et al.*, 2017). Semelhantemente, em culturas de macrófago tratadas com KH-TFMDI, mais de 50% da viabilidade dessas células foi reduzida, principalmente na presença de 100 μ M do composto (Veiga-Santos *et al.*, 2014). Visto isso, um dos critérios observados para se avaliar o potencial das drogas antiparasitárias é a baixa toxicidade destas em células de mamífero. Contudo, estudos indicam que as histonas desacetilases dos tripanosomatídeos possuem especificidades que podem ser exploradas para se desenvolver HDACi seletivos para os parasitos (Veiga-Santos *et al.*, 2014; Hailu *et al.*, 2017).

Os efeitos dos HDACi na ultraestrutura e morfologia celular foram observados por MET e MEV. A partir das imagens geradas e analisadas dos parasitas tratados com o composto KV46, foi possível identificar um inchaço mitocondrial, também observado em tratamentos com a camptotecina em concentrações elevadas, no mesmo tempo de tratamento (Zuma *et al.*, 2011; Zuma *et al.*, 2014). O aparecimento de uma região mais eletrondensa atípica próxima ao axonema também foi observada, sugerindo uma alteração na região paraflagelar. Um achado relacionado foi observado no tratamento com o inibidor KH-TFMDI, que causou o desprendimento do flagelo do corpo celular em aproximadamente 70% dos epimastigotas de *T. cruzi* (Veiga-Santos *et al.*, 2014). Isto nos sugere que esta seja uma importante região de atuação do composto. Em relação ao KV24, a alteração ultraestrutural mais evidente foi o encurtamento do kDNA. Efeitos diretamente associados ao kDNA também foram observados em trabalhos com a acriflavina, um intercalante de DNA, em epimastigotas de *T. cruzi*. Alterações na distribuição do kDNA e formações de massas amorfas foram encontradas na matriz mitocondrial. Sabe-se que o kDNA é composto de milhares de moléculas de DNA interligadas, os maxicírculos e minicírculos, que formam a única rede dentro da matriz mitocondrial. Dessa forma, essa é uma região importante para os tratamentos quimioterápicos, tendo em vista seu papel para a vitalidade do parasito (Manchester *et al.*, 2013).

Em relação às alterações morfológicas, ambos os compostos causaram modificações no corpo celular, resultando em torções e achatamento. No tratamento

com a KV24 ainda foi possível observar uma diminuição do corpo celular em relação aos epimastigotas não tratados. A redução do corpo celular também foi observada em promastigotas de *Leishmania donovani*, na porção posterior, quando tratadas com a vocamina, um inibidor de topoisomerase do tipo I (Chowdhury *et al.*, 2017).

Em relação aos inibidores de topoisomerasas, estudos demonstraram a atividade destes compostos sobre a proliferação celular e a indução de morte celular, por apoptose por exemplo, sendo estas enzimas consideradas alvos atrativos para estudos terapêuticos (Díaz-González *et al.*, 2009). Dos três compostos testados neste trabalho, o 3f foi o que obteve os melhores índices de inibição da proliferação celular apresentando valor de IC₅₀ de 4 µM. O composto 3e, por sua vez, também apresentou bons resultados na inibição e valor de IC₅₀ de 10 µM. Já o 3a, não demonstrou ser tão eficiente na inibição até 10 µM, porém na maior concentração testada se observou uma significativa redução do número de parasitas.

Um estudo realizado nas formas de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com o topotecan, um inibidor de topoisomerase I derivado de camptotecina, demonstrou-se uma atividade semelhante em relação à capacidade de inibir a proliferação dos parasitos nas maiores doses testadas. Porém, diferentemente do presente estudo, as concentrações do composto testado foram mais elevadas (100, 200 e 300 µM) (Lacombe *et al.*, 2014).

Em relação à viabilidade celular, os compostos 3e e 3f foram bem eficazes, diminuindo significativamente o percentual de células viáveis. O composto 3a, portanto, não interferiu de forma expressiva na viabilidade dos parasitos, permitindo um percentual de 95% de células viáveis em 72 horas de tratamento. Efeitos promissores na viabilidade celular de epimastigotas de *T. cruzi* também foram observados por Chowdhury e colaboradores (2017), em testes com a vocamina. Tais achados nos indicam, portanto, que esses inibidores são eficientes e interferem na proliferação e viabilidade celular dos parasitos.

Em relação aos testes de viabilidade celular das culturas de LLC-MK₂, não observamos alteração na viabilidade das células tratadas com 3a, no entanto, o percentual permaneceu bem considerável por parte dos compostos 3e e 3f, nas maiores concentrações testadas, 10 e 20 µM. Um fator importante para se determinar a atuação

desses compostos de forma mais direcionada e específica aos parasitos. Um maior percentual de células viáveis por esses compostos também pode estar associado às diferenças na estrutura e expressão das topoisomerases, principalmente as do tipo I, em mamíferos (Díaz-González *et al.*, 2009).

A ultraestrutura dos parasitos tratados pelo composto 3a não apresentou alterações significativas, uma vez que o núcleo e o cinetoplasto, por exemplo, estavam preservados. Já nos protozoários tratados com o composto 3e, observamos acúmulos de corpos lipídicos, fator também reportado por Veiga-Santos e colaboradores (2013) em epimastigotas de *T. cruzi* tratados com KV-TFMDI. Os corpos lipídicos são considerados depósitos, e seu acúmulo pode estar relacionado a estímulos mediante a células, como macrófagos, e também ácido araquidônico, que induz formação dessas estruturas em mamíferos (Toledo 2013; Toledo *et al.*, 2016). Nos epimastigotas de *T. cruzi* tratados com o composto 3f, por sua vez, observamos desorganizações no complexo de Golgi, estrutura importante para síntese de glicoconjugados no *T. cruzi* (Baptista *et al.*, 2015).

Em relação à morfologia celular, todos os compostos estudados neste trabalho (tanto inibidores de HDAC e de topoisomerases) desencadearam alterações estruturais, como torção e achatamento do corpo celular, vistas principalmente nos parasitos tratados com o inibidor 3f. Estas alterações podem estar relacionadas com a desestabilização de componentes do citoesqueleto ou ainda com proteínas associada aos microtúbulos (Veiga-Santos *et al.*, 2013).

Os efeitos reportados em relação aos epimastigotas de *T. cruzi* e as culturas celulares de LLC-MK₂ nos levam a crer que os compostos 3e e 3f foram os melhores em inibir a proliferação dos parasitas, enquanto apresentaram um baixo percentual de citotoxicidade nas células de mamífero. A respeito dos inibidores de HDACs, o composto KV46 também pode ser um a droga de escolha para futuros testes com as formas infectivas de *T. cruzi*, pois foi o menos tóxico para a LLC- MK₂, ainda que seu IC₅₀ para os epimastigotas não tenha sido o mais baixo de todos. Sendo assim, esses resultados são importantes para o estudo de alvos e compostos promissores contra o *T. cruzi*.

A partir dos dados obtidos, podemos concluir que os inibidores de histonas desacetilases e de topoisomerasas testados neste trabalho têm um perfil de atuação importante para os estudos quimioterápicos nos tripanossomatídeos, uma vez que foram capazes de interferir com a proliferação celular de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* ao mesmo tempo que apresentaram baixa toxicidade em linhagem celular de mamífero.

VII. CONCLUSÃO

- Os inibidores de histonas desacetilases e topoisomerases foram capazes de inibir o crescimento dos epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Todos os inibidores reduziram significativamente a viabilidade celular dos parasitos, nas maiores concentrações testadas;
- Ambas as classes de compostos, de forma geral, apresentaram baixa toxicidade nas culturas de LLC-MK₂.
- Os inibidores causaram alterações na ultraestrutura celular dos parasitos, destacando-se alterações na estrutura paraflagelar e diminuição do kDNA nos parasitos tratados com os inibidores de HDAC, e acúmulos de corpos lipídicos e desorganização do complexo de Golgi, nos parasitos tratados com os inibidores de topoisomerases;
- Nossos resultados indicam que os inibidores testados são eficientes, podendo ser amplamente utilizados em novos estudos quimioterápicos.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAS A, MUÑOZ C, BALLART C, BERENGUER P, LLOVET T, HERRERO M, TEBAR S, PINAZO MJ, POSADA E, MARTÍ C, FUMADÓ V, BOSCH J, COLL O, JUNCOSA T, GINOVART G, ARMENGOL J, GASCÓN J, PORTÚS M, GÁLLEGO M. (2017). Towards a New Strategy for Diagnosis of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Clin Microbiol.* 55(5):1396-1407.
- ALSFORD, S.; HORN, D. (2004). Trypanosomatid histones. *Molecular Microbiology.* 53(2), 365–372.
- ANDRADE, VIRGÍNIA, ANDRADE, SONIA G., NETTO, MANOEL BARRAI, PONTES, ALBÉLIA L., & CASTRO, ROSÂNGELA. (1985). Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 18(3), 143-154.
- AZZI, A.; COSSEAU, C.; GRUNAU, C. (2009). *Schistosoma mansoni*: Developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. *Exp. Parasitol.*, 121, 288-291.
- BALANÑA-FOUCE R, ALVAREZ-VELILLA R, FERNÁNDEZ-PRADA C, GARCÍA-ESTRADA C, REGUERA RM. (2014). Trypanosomatids topoisomerase revisited. New structural findings and role in drug discovery. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 24;4(3):326-37.
- BALANÑA-FOUCE R, REDONDO CM, PÉREZ-PERTEJO Y, DÍAZ-GONZÁLEZ R, REGUERA R. (2006). Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I. *Drug Discov Today*;11:733–40.
- BAPTISTA CG; RODRIGUES EC; MORKING P; KLINKE A; ZARDO ML; SOARES MJ; DE AGUIAR AM; GOLDENBERG S; RAMOS AS. (2015). Identification of a Golgi-localized UDP-N-acetylglucosamine transporter in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.* 21;15:269. doi: 10.1186.
- BERN C, MONTGOMERY SP, HERWALDT BL, RASSI A JR, MARIN-NETO JA, DANTAS RO, MAGUIRE JH, ACQUATELLA H, MORILLO C, KIRCHHOFF LV, GILMAN RH, REYES PA, SALVATELLA R, MOORE AC. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.*298(18):2171-81.
- BUCKNER FS, WILSON AJ, WHITE TC, VAN VOORHIS WC. (1998). Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* ;42(12):3245-50.
- BURLEIGH, AB; ANDREWS, WN. (1995). The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. *AIHIII Rev. Microbiol.*49:175-200.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1: 159-218.
- CHAMPOUX, J.J. (2001). DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70: 369-413.
- CHOWDHURY SR; KUMAR A; GODINHO JLP; DE MACEDO SILVA ST; ZUMA AA; SAHA S; KUMARI N; RODRIGUES JCF; SUNDAR S; DUJARDIN JC; ROY S; DE SOUZA

- W; MUKHOPADHYAY S; MAJUMDER HK. (2017). Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. *Biochem Pharmacol.* 138:19-30. doi: 10.1016.
- CHUA MJ, ARNOLD MS, XU W, LANCELOT J, LAMOTTE S, SPÄTH GF, PRINA E, PIERCE RJ, FAIRLIE DP, SKINNER-ADAMS TS, ANDREWS KT. (2017). Effect of clinically approved HDAC inhibitors on *Plasmodium*, *Leishmania* and *Schistosoma* parasite growth. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* Apr;7(1):42-50.
- DE CARVALHO TM, DE SOUZA W. (1989). Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct.* 14(4):383-92.
- DE JESUS TC, NUNES VS, LOPES MDE C, MARTIL DE, IWAI LK, MORETTI NS, MACHADO FC, DE LIMA-STEIN ML, THIEMANN OH, ELIAS MC, JANZEN C, SCHENKMAN S, DA CUNHA JP. (2016). Chromatin Proteomics Reveals Variable Histone Modifications during the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteome Res.* 15(6):2039-51.
- DE SOUZA, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, 8: 269-285.
- DE SOUZA, W. (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res.* 88: 1013–1025.
- DIAS E, LARANJA FS, MIRANDA A, NOBREGA G. (1956). Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* 14(6):1035-60.
- DIAS JC. (1997). Cecílio Romãña, Romãña's sign and Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30(5):407-13.
- DIAS, J C P et al . (2016). II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 25, n. spe, p. 7-86. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000500007&lng=en&nrm=iso>. acesso em Nov 7. 2017. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>.
- DIAS, J.C.P; BORGES-PEREIRA, J.; MACEDO, V.O. DOENÇA DE CHAGAS. (2013). In: COURA, J.R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 606-641.
- DÍAZ-GONZÁLEZ R; PÉREZ-PERTEJO Y; PRADA CF; FERNÁNDEZ-RUBIO C; BALAÑA-FOUCE R; REGUERA RM. (2009). Novel findings on trypanosomatid chemotherapy using DNA topoisomerase inhibitors. *Mini Rev Med Chem.* 9(6):674-86.
- DO CAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHELOFF, P. & MORENO, S. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Rev Microbiol* 3: 251-261.
- EGÜEZ KE, ALONSO-PADILLA J, TERÁN C, CHIPANA Z, GARCÍA W, TORRICO F, GASCON J, LOZANO-BELTRAN DF, PINAZO MJ. (2017). Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(4):e0005501.

- GIRARD-DIAS, W, ALCÂNTARA CL, CUNHA-E-SILVA N, DE SOUZA W, MIRANDA K. (2012). On the ultrastructural organization of *Trypanosoma cruzi* using cryopreparation methods and electron tomography. *Histochem Cell Biol.* 138(6):821-31.
- HAILU GS; ROBAA D; FORGIONE M; SIPPL W; ROTILI D; MAI A. (2017). Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites: Past, Present, and Future Perspectives. *J Med Chem.* 22;60(12):4780-4804. doi: 10.1021.
- HENRIQUES C, MOREIRA TLB, MAIA-BRIGAGÃO C, HENRIQUES-PONS A, CARVALHO TMU, DE SOUZA W. (2011). Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. *Anal Methods*;3:2148–55.
- JOBE M, ANWUZIA-IWEGBU C, BANFUL A, BOSIER E, IQBAL M, JONES K, LECUTIER SJ, LEPPER K, REDMOND M, ROSS-PARKER A, WARD E, WERNHAM P, WHIDDEN EM, TYLER KM, STEVERDING D. (2012). Differential in vitro activity of the DNA topoisomerase inhibitor idarubicin against *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(7):946-50.
- LACOMBE OK, ZUMA AA, DA SILVA CC, DE SOUZA W, MOTTA MC. (2014). Effects of camptothecin derivatives and topoisomerase dual inhibitors on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. *J Negat Results Biomed.* 10;13(1):11.
- LIMA DB; SOUSA PL; TORRES AF; RODRIGUES KA; MELLO CP; MENEZES RR; TESSAROLO LD; QUINET YP; DE OLIVEIRA MR; MARTINS AM. (2016). Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. *Toxicon.* 15;120:128-32. doi: 10.1016.
- LUQUETTI, A; MOREIRA, FE; GADELHA S, MF; GOMES, MY; RIBINIK R, ML; MARTELETO, AM. (1998). Doença de Chagas: triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. pp. 80.
- MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P; PENA, S.D.J. (2002). Chagas' Disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*, 4: 1-16.
- MAGALLÓN-GASTÉLUM, E; MAGDALENO-PEÑALOZA, C N; KATTHAIN-DUCHATEAU, G; TRUJILLO-CONTRERAS, FRANCISCO; LOZANO-KASTEN, J F; HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, J R. (1998). Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), en el estado de Jalisco, México. *Rev Biomed*; 9:151-157.
- MANCHESTER T; CAVALCANTI DP; ZOGOVICH M; DE SOUZA W; MOTTA MC. (2013). Acriflavine treatment promotes dyskinetoplasty in *Trypanosoma cruzi* as revealed by ultrastructural analysis. *Parasitology.* 140(11):1422-31. doi: 10.1017.
- MARTÍNEZ-IGLESIAS, O.; RUIZ-LLORENTE, L.; SÁNCHEZ-MARTINEZ, R.; GARCÍA, L.; MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. CAMPAIGN FOR ACCESS TO ESSENTIAL MEDICINES. (2008).

International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 41(3):315-9.

MELESINA, J; ROBAA, D; PIERCE, RJ; ROMIER, C; SIPPL, W. (2015). Homology Modeling of Parasite Histone Deacetylase to Guide the Structure-Based Design of Selective Inhibitors. J Mol Graph Model. 62:342-61.

MELLO CP; LIMA DB; MENEZES RR, BANDEIRA IC, TESSAROLO LD, SAMPAIO TL, FALCÃO CB, RÁDIS-BAPTISTA G, MARTINS AM. (2017). Evaluation of the Antichagasic Activity of Batroxidin, a Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide found in *Bothrops atrox* Venom Gland. Toxicon. 130:56-62. doi: 10.1016.

MONNERET, C. (2005). Histone deacetylase inhibitors. Eur J Med Chem. 40(1):1-13.

MORETTI NS; DA SILVA AUGUSTO L; CLEMENTE TM; ANTUNES RP; YOSHIDA N; TORRECILHAS AC; CANO MI; SCHENKMAN S. (2015). Characterization of *Trypanosoma cruzi* Sirtuins as Possible Drug Targets for Chagas Disease. Antimicrob Agents Chemother. 59(8):4669-79. doi: 10.1128.

MORRIS, JC.; DREW, ME.; KLINGBEIL, MM.; MOTYKA, SA.; SAXOWSKY, TT.; WANG, Z.; ENGLUND, PT. (2001). Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. Int J Parasitol. 1;31(5-6):453-8.

MORILLA MJ, ROMERO EL. (2015). Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. Nanomedicine (Lond). 10(3):465-81. doi: 10.2217/nnm.14.185.

OLINS, DE.; OLINS, AL. (2003). Chromatin History: Our View From the Bridge. Nat Rev Mol Cell Biol. 4(10):809-14.

PALCHAUDHURI R, HERGENROTHER PJ. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. Curr Opin Biotechnol;18:497–503.

PERON F; LAZARIN-BIDÓIA D; UD DIN Z; RODRIGUES-FILHO E; UEDA-NAKAMURA T; SILVA SO; NAKAMURA CV. (2017). Effects of (1E,4E)-2-Methyl-1,5-bis(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one on *Trypanosoma cruzi* and Its Combinational Effect with Benznidazole, Ketoconazole, or Fluconazole. Biomed Res Int. 2017:7254193. doi: 10.1155/2017/7254193.

PICCHI GF, ZULKIEVICZ V, KRIEGER MA, ZANCHIN NT, GOLDENBERG S, DE GODOY LM. (2017). Post-translational Modifications of *Trypanosoma cruzi* Canonical and Variant Histones. J Proteome Res. 16(3):1167-1179. doi: 10.1021.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE RESENDE, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 26(2):275-91.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, JA. (2010). Chagas disease. Lancet. 375(9723):1388-402.

RODRIGUES COURA J, DE CASTRO SL. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(1):3-24.

RODRIGUES J. C. F.; GODINHO J. L. P; DE SOUZA W. (2014). Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In: SANTOS LS, A; BRANQUINHA, HM; D'AVILA-LEVY, M C; KNEIPP, F L; SODRÉ, LC. (Eds). Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. New York London: Springer Dordrecht Heidelberg. pp 1-42.

SANTOS, J O. (2014). Estudo dos efeitos da Tricostatina A, um inibidor de histona desacetilase, sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. Rio de Janeiro, 68f.

SEIRINGER P, PRITSCH M, FLORES-CHAVEZ M, MARCHISIO E, HELFRICH K, MENGELE C, HOHNERLEIN S, BRETZEL G, LÖSCHER T, HOELSCHER M, BERENS-RIHA N. (2017). Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. Diagn Microbiol Infect Dis. pii: S0732-8893(17)30114-1.

SHAHBAZIAN D., M; GRUNSTEIN, M. (2007). Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. Rev. Biochem. 76:75–100.

TOLEDO, DA. (2013). Corpúsculos Lipídicos em Trypanosoma Cruzi: Análise e Correlação com a Fisiopatologia da Doença de Chagas. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 89f.

TOLEDO DA; ROQUE NR; TEIXEIRA L; MILÁN-GARCÉS EA; CARNEIRO AB; ALMEIDA MR; ANDRADE GF; MARTINS JS; PINHO RR; FREIRE-DE-LIMA CG; BOZZA PT; D'AVILA H; MELO RC. (2016). Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. PLoS One. 11(8):e0160433. doi: 10.1371.

TSAO YP, D'ARPA P, LIU LF. (1992). The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest: altered regulation of p34cdc2/cyclin B. Cancer Res. Apr 1;52(7):1823-9.

VEIGA-SANTOS P; REIGNAULT LC; HUBER K; BRACHER F; DE SOUZA W; DE CARVALHO TM. (2014). Inhibition of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) causes growth arrest and activates both apoptosis and autophagy in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 141(6):814-25. doi: 10.1017.

VERÇOZA BR, GODINHO JLP, DE MACEDO-SILVA ST, HUBER K, BRACHER F, DE SOUZA W, RODRIGUES JCF. KH-TFMDI. (2017). A Novel Sirtuin Inhibitor, Alters the Cytoskeleton and Mitochondrial Metabolism Promoting Cell Death in *Leishmania Amazonensis*. Apoptosis. 22(9):1169-1188. doi: 10.1007/s10495-017-1397-8.

VICKERMAN, K.; PERSTON, TM. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. J. Cell Sci. 6,365-383.

WALECKX E, GOURBIÈRE S, DUMONTEIL E. (2015). Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 110(3):324-38.

WOYNAROWSKI JM, CHAPMAN WG, NAPIER C, HERZIG MC, JUNIEWICZ P. (1998). Sequence and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol*;54:770–7.

ZAMBRANO, A.; ARANDA, A. (2008). Histone deacetylase inhibitors mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clin Transl Oncol*. 10(7):395-8.

ZINGALES B. (2011). *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia* 6b: 44-48.

ZUMA AA, CAVALCANTI DP, MAIA MC, DE SOUZA W, MOTTA MC. (2011). Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*. 37(5):449-56.

ZUMA, AA. (2010). Estudo do Efeito de Inibidores de Topoisomerasas e Ligantes de Dna na Proliferação e Ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 123f.

ZUMA AA, MENDES IC, REIGNAULT LC, ELIAS MC, DE SOUZA W, MACHADO CR, MOTTA MC. (2014). How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. *Mol Biochem Parasitol* 193(2):93-100.