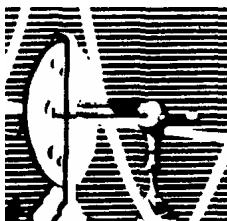


**VICTOR BARBOSA SARAIVA**

**Ação da miltefosina sobre a  $\text{Na}^+$ -ATPase e  
proteína cinase C do *Trypanosoma cruzi* e  
efeitos no tratamento da infecção aguda  
em modelo experimental murino**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO  
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Saraiva, Victor Barbosa

IBCCF, 2008, páginas XII-102.

Tese: Doutor em Ciências

1 - Doença de Chagas 2 - Quimioterapia 3 - Miltefosina

4 - Mecanismo de ação 5 - Histopatologia

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

II. Título: **Miltefosina: Na<sup>+</sup>-ATPase e proteína cinase C como possíveis alvos no *Trypanosoma cruzi* e efeitos no tratamento da infecção aguda em modelo experimental murino.**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Glicobiologia sob a orientação do Dr. Norton Heise com o auxílio financeiro das seguintes instituições:

1. Coordenadoria de Aperfeiçoamento em Pesquisa de Nível Superior (CAPES).
2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
3. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## AGRADECIMENTOS

À minha Filha, Júlia de Faria Saraiva, a pessoa que mais amo na vida.

À minha esposa, Débora Goulart de Faria, por todos estes anos de companheirismo.

Aos meus pais, Nelson Leitão Saraiva e Maria da Graça Barbosa, por toda a minha formação.

Aos meus avós, Arnaldo Saraiva e Aurea Leitão Saraiva, meus maiores incentivadores.

Aos meus tios, Luiz Fernando da Silva Reis e Dea Saraiva da Silva Reis, por todos os anos que convivemos juntos e pela ajuda em minha formação.

Ao meu orientador, Dr. Norton Heise, pela orientação e contribuição para o meu crescimento profissional.

A Dra. Lúcia Mendonça Previato e ao Dr José Osvaldo Previato pela orientação profissional e amizade.

A Dra. Andrea Henriques pela orientação e amizade.

A Dra Christina Maeda Takiya, pela orientação, amizade e apoio nos momentos difíceis.

A Dra. Adriane Regina Todeschini, pela orientação e amizade.

Ao amigo, Dr. Celso Caruso-Neves, pela colaboração, orientação e acima de tudo pela amizade.

A amiga, Dra Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves, pela orientação e amizade.

Aos meus colegas e amigos, Orlando Augusto Agrellos, e Daniel Gibaldi, Leonardo Freire de Lima e Frederico Alisson Silva pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao colega e amigo Sebastião Teixeira de Carvalho, pela consideração, por todos os momentos de descontração, engarrafamento, sofrimento com o Fogão etc.

Aos colegas do laboratório de Glicobiologia, Luciana Pacheco Penha, Alexandre Romeiro, Juliana Manasfi Figueiredo, Lana Cristina dos Santos Valvano, Iara Alice Medeiros de Souza, Daniel Passos da Silva, Leticia Hallack Fabrino, Nivea Calisto, Suellen Villena Neo, Bianca Cruz Neves, Katherine Antunes de Matos Oliveira, Carolina Macedo Koeller, Renata Santana, Kelli Monteiro da Costa e Andreia Dantas Medeiros pelo companheirismo.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação da miltefosina sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase e Proteína Cinase C do *Trypanosoma cruzi* e comparar seus efeitos com os do benzonidazol na terapia experimental de camundongos BALB/c na fase aguda da infecção causada pela cepa Y do parasita. Levando em consideração que mecanismos envolvidos na homeostase devam ser cruciais para a sobrevivência do parasita, uma atividade Na<sup>+</sup>-ATPase insensível a ouabaína e sensível à furosemida e preferencialmente associada a uma fração enriquecida de membrana de formas epimastigotas foi parcialmente caracterizada em relação ao pH ótimo, dependência de íons e detergente. Esta atividade Na<sup>+</sup>-ATPase parece desempenhar um papel importante no crescimento do parasita uma vez que a proliferação de formas epimastigotas foi inibida de maneira dose-dependente pela furosemida. Foi observado que a miltefosina inibe a Na<sup>+</sup>-ATPase de forma dose-dependente e inibe também uma proteína quinase C (PKC) do parasita, sendo ambas as atividades observadas na fração enriquecida de membrana. Os resultados mostraram que, ao contrário do observado em mamíferos, a atividade PKC residente e estimulada por PMA de *T. cruzi* não é capaz de estimular a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase, mas parece sim ser capaz de inibi-la. Estudos *in vivo* demonstraram que tanto o benzonidazol quanto a miltefosina age diretamente sobre o *T. cruzi* diminuindo a parasitemia na fase aguda da infecção em modelo murino. Além disso, enquanto análises histopatológicas demonstraram significativa redução dos infiltrados inflamatórios e eliminação dos ninhos de amastigotas, e análises imunohistoquímicas apontaram uma acentuada redução na quantidade de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos infiltrados e de antígeno do parasita. Dosagens plasmáticas do isotipo cardíaco de creatina quinase confirmaram a manutenção da integridade do tecido cardíaco dos animais infectados e tratados. Em conjunto, os efeitos imunomodulatórios de ambas as drogas reduzem o dano do tecido cardíaco ocasionada pela inflamação. Uma caracterização fenotípica parcial dos linfócitos T cardíacos através da expressão de moléculas envolvidas no processo migratório e de ativação (respectivamente CD62L, LFA-1 e CD2) foi realizada por citometria de fluxo. As alterações mais marcantes foram observadas nas células T

cardíacas após o tratamento com miltefosina, com uma diminuição do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando moléculas CD2<sup>+</sup>. Os resultados sugerem que essas células do infiltrado inflamatório do coração dos animais tratados com miltefosina estejam menos ativadas que as observadas nos animais infectados e infectados e tratados com benzonidazol.



## **ABSTRACT**

The aim of this project was to study the action of miltefosine on *Trypanosoma cruzi* Na<sup>+</sup>-ATPase and Protein Kinase C, and compare the effects with the ones from benznidazole in the experimental therapy in BALB/c mice at the acute phase of the infection caused by parasites from the Y strain. Considering that mechanisms involved in homeostasis should be crucial to parasite survival, Na<sup>+</sup>-ATPase activity indifferent to ouabain and sensible to furosemide preferably associated to an enriched epimastigote membrane fraction was partially characterized according to optimal pH, ion dependence and presence of detergent. This Na<sup>+</sup>-ATPase activity seems to have an important role in the growth of the parasite since the proliferation of epimastigote forms was dose-dependently inhibited by furosemide. It could be observed that miltefosine inhibits Na<sup>+</sup>-ATPase in a dose-dependent fashion and also inhibits a protein kinase C (PKC) in the enriched membrane fraction of the parasite. The results revealed that, although different from mammals, resident- and PMA-stimulated PKC is not able to stimulate Na<sup>+</sup>-ATPase activity, but seems in fact to be able to inhibit it. *In vivo* studies showed that both benznidazole and miltefosine act directly on *T. cruzi* decreasing parasitemia in the acute phase infection in a murine model. More over, histopathologic analyses demonstrated significant reductions of inflammatory infiltrates and elimination of amastigote nests, and imunohistochemical analyses pointed to a high reduction of T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> cells in the infiltrates and of the parasite's antigen. The plasma dose of cardiac isotype of kinase creatine confirmed the integrity of cardiac tissue of infected and treated animals. Altogether, immunomodulatory effects of both drugs prevent damage to cardiac tissue caused by inflammation. A partial phenotypic feature of T cardiac lymphocytes through molecule expression involved in migratory process and activation (respectively CD62L, LFA-1 and CD2) was performed by flow cytometry. The most remarkable changes were noticed in T cells isolated from the heart after treatment with miltefosine, showing a reduction of the percentual of both T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> cells expressing CD2<sup>+</sup>. The results suggested that these cells in the inflammatory infiltrate of cardiac tissue of animals treated with miltefosine are less activated than

the ones observed in infected and untreated animals and in mice infected and treated with benznidazole.

## ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Principais aspectos da doença de ChagasDoença	1
1.2 Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma. cruzi</i>	2
1.3 Parasito e forma de transmissão	4
1.4 Manifestação clínica da Doença de Chagas	6
1.5 Interação do parasito com a célula hospedeira e invasão	8
1.6 Homeostase iônica e crescimento do <i>T. cruzi</i>	12
1.7 Apresentações patológicas no modelo experimental da doença de Chagas em camundongo	14
1.8 Resposta imune à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	15
1.9 Tratamento da doença de Chagas	16
1.10 Drogas em teste para o tratamento da doença de Chagas	18
1.11 Miltefosina.	21
<b>2. Objetivos</b>	25
<b>3. Materiais e Métodos</b>	26
3.1 Materiais	26
3.2 Mecanismos de Ação da Miltefosina	27
3.2.1 Parasitos e condições de cultivo	27
3.2.1.1 <i>T.cruzi</i> forma epimastigota	27
3.2.1.2 <i>T. cruzi</i> forma tripomastigota	27
3.2.2 Fração enriquecida de membrana plasmática (FM) de <i>T.cruzi</i> epimastigota	28
3.2.3 Isolamento da membrane baso lateral de células isoladas de rim de porco	29
3.2.4 Verificação da atividade Na <sup>+</sup> -ATPase da FM do <i>T. cruzi</i> na forma epimastigotas e MBL de rim de porco	30

3.2.5 Efeito da miltefosina, Na <sup>+</sup> , Ca <sup>++</sup> , e DOC sobre a atividade Na <sup>+</sup> -ATPase	30
3.2.6 Efeitos da furosemida (inibidor da Na <sup>+</sup> -ATPase) no crescimento do <i>T. cruzi</i>	31
3.2.7 Verificação da atividade Na <sup>+</sup> -ATPase do <i>T. cruzi</i> “dependente” de PKC	31
3.2.8 Immunoblotting	31
3.2.9 Verificação da atividade PKC	32
3.3 Verificação da ação da miltefosina (ensaios in vivo)	32
3.3.1 Parasitos e infecção	32
3.3.2 Tratamento	33
3.3.3 Parasitemia	33
3.3.4 Histopatologia	33
3.3.5 Imunohistoquímica – Detecção de células TCD4 <sup>+</sup> , TCD8 <sup>+</sup> e antígenos das formas amastigota de <i>T. cruzi</i>	34
3.3.6 Coleta e marcação de células inflamatórias para citometria de fluxo	35
3.3.7 Bioquímica sérica	35
3.4 Análise estatística dos dados	36
<b>4. Resultados</b>	
4.1 Possíveis mecanismos de ação da miltefosina: estudos in vitro	37
4.1.1 Papel da Na <sup>+</sup> -ATPase no crescimento do <i>T. cruzi</i>	37
4.1.2 Modulação da Na <sup>+</sup> -ATPase pela miltefosina	41
4.1.3 Verificação da atividade da PKC e sua possível modulação pela miltefosina e interferência na atividade Na <sup>+</sup> -ATPase	45
4.2 Efeitos da miltefosina no tratamento de camundongos BALB/c em fase aguda da infecção pelo <i>T. cruzi</i> cepa Y.	47

4.2.1 Efeitos da miltefosina e do benzonidazol na parasitemia de camundongos BALB/c infectados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> .	48
4.2.2 Avaliação histopatológica do tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> cepa Y e tratados com benzonidazol ou miltefosina	50
4.2.3 Verificação da presença de antígenos do <i>T. cruzi</i> forma amastigotade no tecido cardíaco	55
4.2.4 Quantificação das células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> do infiltrado inflamatório cardíaco	58
4.2.5 Análise do perfil do fenótipo de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> do infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados e tratados ou não com benzonidazol e miltefosina	63
4.2.6 Avaliação da atividade da enzima Creatina Quinase, isotipo cardíaco (CK-MB), do plasma de camundongos BALB/c infectados com o <i>T. cruzi</i>	67
<b>5. Discussão</b>	68
<b>6. Conclusão</b>	78
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	79
<b>8 Anexo</b>	103

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Principais aspectos da doença de Chagas.

A doença de chagas é assim denominada em homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas. Foi comunicada a comunidade científica em 1909, quando Carlos Chagas realizava uma campanha contra a malária que atingia operários que trabalhavam na construção de um trecho da Estrada de Ferro Central do Brasil, na região norte do Estado de Minas Gerais. Carlos Chagas descreveu o agente etiológico, o transmissor e o modo de transmissão da doença. Segundo Moncayo, (1999) cerca de 16-18 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *T. cruzi* e aproximadamente 120 milhões residem em áreas de risco de infecção. Em 9 de Junho de 2006, em sua 15ª reunião anual, a Comissão Intergovernamental do Cone Sul de Iniciativa contra a doença de Chagas declarou formalmente que o Brasil livrou-se da doença de Chagas transmitida pelo *Triatoma infestans* (Massad *et al.*, 2007). Isto representa um feito notável considerando que esta espécie tinha sido o principal vetor doméstico que infestava casas rurais na maioria dos 700 municípios dos 12 mais populosos estados do Brasil, além de vastas áreas de países vizinhos do Cone Sul. Em toda a América Latina, a transmissão do *Trypanosoma cruzi*, tem sido progressivamente reduzida por meio de uma série de iniciativas multinacionais coordenadas pela Organização Pan Americana da Saúde. Além do Brasil, a transmissão foi eficazmente eliminada no Uruguai (1997), Chile (1999), importantes áreas da Argentina, Bolívia e Paraguai, e partes da América Central. A prevalência Global da doença foi reduzida a partir de 1990 e as estimativas que eram de 16-18 milhões de pessoas infectadas, diminuíram para 9 milhões e pode se esperar a diminuir através de alterações demográficas e como resultado do controle atual (Schofield *et al.*, 2006). Entretanto, apesar dos dados indicarem uma redução do número de pessoas infectadas, a cada ano são registrados 670.000 novos casos da doença (WHO 2004).

## **1.2 Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi***

O *T.cruzi* possui um ciclo de vida complexo que envolve insetos triatomíneos e vertebrados o que pode ser visto de maneira esquemática e simplificada na Figura 1(Brener, 1973). Durante o seu repasto sangüíneo, o inseto triatomíneo (“Barbeiro”), vetor da doença de Chagas, adquire o *Trypanosoma cruzi* na forma tripomastigota sangüínea que se diferencia em epimastigota no estômago do inseto e inicia vários ciclos de divisão. No final do tubo digestivo, (intestino e reto) sofre nova diferenciação e passa à forma tripomastigota metacíclica, que é infectiva. Novamente durante o repasto, após a ingestão de sangue do vertebrado, o inseto defeca próximo ao local da picada e através da mucosa ou descontinuidades do tecido o parasito penetra no hospedeiro podendo invadir as células nucleadas. Na célula o tripomastigota diferencia-se em amastigota, inicia, ciclos de divisão e após vários ciclos de multiplicação diferencia-se em forma tripomastigota que rompe a célula podendo infectar novas células ou alcançar a corrente sangüínea de onde poderá novamente ser ingerido pelo Barbeiro (Figura 1)

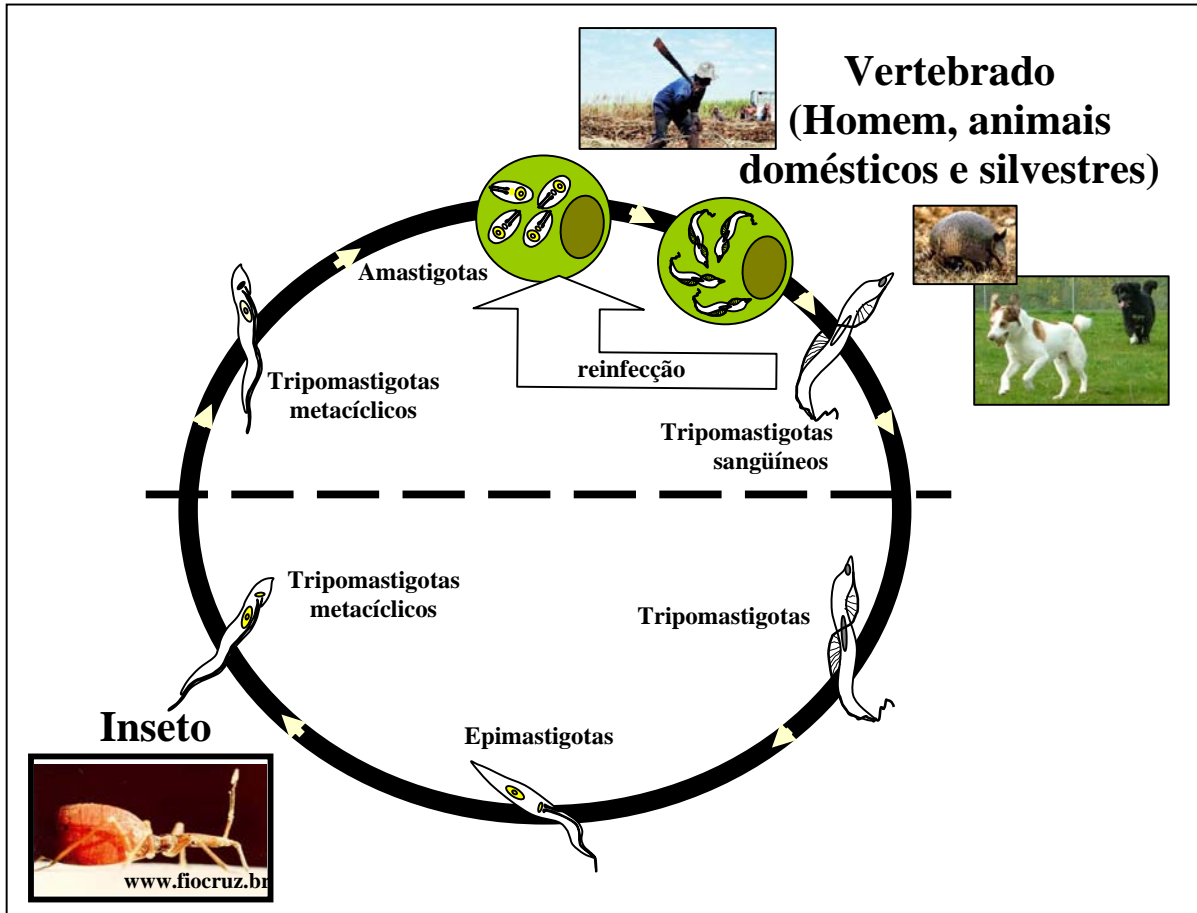


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (Saraiva VB, 2008)



### 1.3 – Parasita e formas de transmissão

Existem várias cepas do *Trypanosoma cruzi*, que diferem entre si em relação à epidemiologia, patogênese, resposta ao tratamento e bioquímica (Zingales *et al.* 1999). A ausência de uma nomenclatura comum tem prejudicado a correlação do complexo clínico e epidemiológico com a manifestação da doença (Jones *et al.*, 2004; Valadares *et al.*, 2008). Cepas heterogêneas que podem estabelecer a infecção em uma vasta gama de hospedeiros mamíferos exibem tropismo para diferentes tipos de tecidos (Melo e Brener 1978), variando na patologia e manifestação clínica durante a infecção, e podem ocasionar a morte ou graves danos ao coração ou ao trato digestivo durante a fase crônica da doença de Chagas (Rossi e Ramos 1996). As causas desta vasta variabilidade não são conhecidas. No entanto, recentemente foi proposta uma correlação entre a clínica e as variações genéticas do *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 2002; Devera *et al.* 2003). O agrupamento de várias cepas de *T. cruzi* têm sido desenvolvido, a fim de compreender o papel da diversidade do parasita na patogênese da doença (Andrade *et al.*, 2002). Com base em estudos bioquímicos e moleculares, foi observado que as cepas do *T. cruzi* podem ser divididas em dois grandes grupos (Miles *et al.*, 1977; Souto *et al.*, 1996), que foram padronizados como *T. cruzi I* e *T. cruzi II* (Luquetti *et al.*, 1999).

As amostras designadas como *T. cruzi I* são equivalentes ao Tipo III (Andrade *et al.*, 1974), ao Zimodema 1 (Miles *et al.*, 1977, 1978, Barrett *et al.*, 1980), ao Ribodema II/III (Clark e Pung 1994), ao Grupo 1 (Tibayrenc 1995) e a Linhagem II (Souto *et al.*, 1996). As amostras classificadas como *T. cruzi II* são equivalentes ao Tipo II (Andrade *et al.*, 1974), ao Zimodema 2 (Miles *et al.*, 1977, 1978, Barrett *et al.*, 1980), ao Zimodema A (Romanha *et al.*, 1979), ao Ribodema I (Clark e Pung 1994), ao Grupo 2 (Tibayrenc 1995) e a Linhagem I (Souto *et al.*, 1996). Existe ainda um grupo de “amostras híbridas” que são características do Tipo I (Andrade *et al.*, 1974), do Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1978, 1981), do Zimodema B (Romanha *et al.*,

1979), do Zimodema Chileno 2b (Milles *et al.*, 1984), do genótipo 39 (Tibayrenc 1995) e do Grupo ½ (24S $\alpha$  rDNA) (Souto *et al.*, 1996).

Estudos biológicos e epidemiológicos atuais fornecem evidências para uma associação do *T. cruzi* II com o ciclo doméstico principalmente envolvido na infecção humana, enquanto que *T. cruzi* I está associado com o ciclo silvestre, afetando marsupiais e edentados (Zingales *et al.*, 1998), e raramente infecta seres humanos (Briones *et al.*, 1999). Presumivelmente a variabilidade observada durante a infecção por diferentes cepas de *T. cruzi* é resultado da diversidade das interações parasita / hospedeiro resultantes da variabilidade das macromoléculas expressas tanto na superfície dos parasitas como das células hospedeiras

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial, que ocorre através de insetos triatomíneos hematófagos de diferentes espécies entre elas o *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sórdida*, *Pastrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*. Em virtude do vetor habitar ambientes silvestres e devido a ocupação dessas regiões pelo homem, o parasita possui dois ciclos de transmissão. O ciclo doméstico ocorre em residências, instaladas próximas a regiões silvestres, que propiciam o desenvolvimento e a proliferação do triatomíneo (Coura, 2007). Nesse caso o homem é infectado e passa a ser reservatório permanente do parasita. No ciclo silvestre, triatomíneos desenvolvem-se em ninhos localizados na vegetação e quando infectados transmitem o *T. cruzi* para pequenos animais mamíferos tornando-os parte do ciclo do parasita (WHO, 2002). Os ciclos domésticos e silvestres podem estar relacionados, já que animais e o próprio homem podem ter contato com o ambiente silvestre e transportar o parasita para o ciclo doméstico (Milles *et al.*, 2003). Além da transmissão vetorial, outros mecanismos de transmissão da doença de Chagas são observados, como a transmissão transfusional, a congênita (Okumura *et al.*, 2004) , transmissão oral (Benchimol-Barbosa, 2006), transfusão sanguínea, transplante de órgãos e através de acidentes laboratoriais (Prata, 2001).

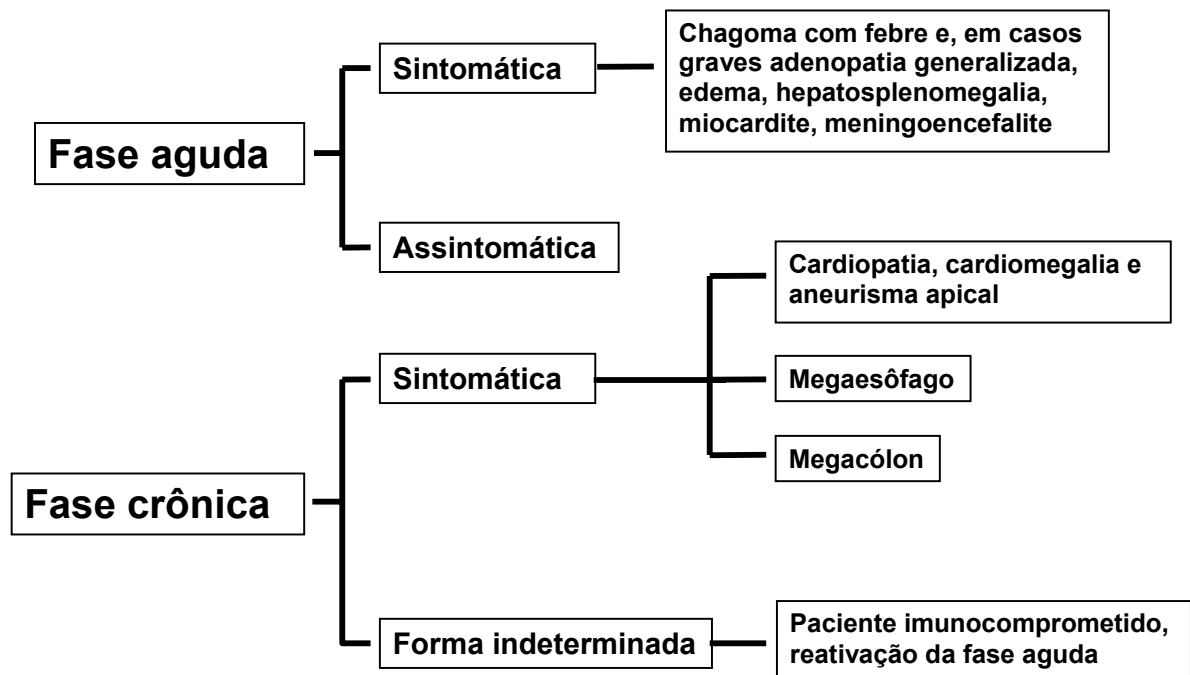
#### **1.4 – Manifestações clínicas da doença de Chagas**

As apresentações clínico-patológicas da doença de Chagas no homem são divididas em duas fases: aguda e crônica (Figura. 2). A fase inicial ou aguda com evidente parasitemia observada no exame direto do sangue que na maioria dos casos não há sintomas, mas nos casos sintomáticos há sinais de inoculação (chagoma ou sinal de Romanã) com febre e, em casos graves adenopatia generalizada, edema, hepatosplenomegalia, miocardite, e meningoencefalite (Coura 2007). Esta fase inicial pode ser seguida por uma fase crônica que, na maioria dos casos se apresenta como uma forma indeterminada (assintomática, com resultados normais de eletrocardiograma e raio-X do coração, esôfago e cólon), que pode evoluir para a forma cardíaca ou digestiva (megaesôfago, megacólon), ou formas cardíaca e digestiva juntas (Coura, 2007). A chamada forma congênita também pode ocorrer, por meio de transmissão através da placenta, o que pode dar origem a aborto, prematuridade ou lesões orgânicas no feto ou através do canal vaginal durante o parto (Torrice *et al.*, 2005). Em casos de imunossupressão, a infecção crônica pode se tornar aguda novamente, produzindo, assim, miocardite difusa, lesões do sistema nervoso central, e meningoencefalite grave.

Na fase crônica, a infecção pode apresentar-se como uma forma indeterminada, em que cerca de 40% dos indivíduos infectados permanecem totalmente assintomáticos, com características anatômica e fisiológica normais para o coração, esôfago e cólon. Embora eles sejam assintomáticos, esses pacientes apresentam reações sorológicas positivas para a infecção pelo *T. cruzi* e, em muitos destes pacientes, os resultados do xenodiagnóstico e do PCR podem ser repetidas vezes positivos ao longo de muitos anos. Assim, eles apresentam um verdadeiro equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (Coura *et al.* 1985, 1999).

A fase crônica cardíaca é a mais expressiva manifestação da doença de Chagas, tanto por causa de sua frequência quanto sua gravidade. Ela geralmente aparece entre a segunda e quarta décadas de vida, de cinco a quinze anos após a infecção inicial. Os sinais e sintomas de cardiopatia chagásica crônica resultam de

arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueios do ramo atrio-ventricular e em tromboembolia (Coura, 2007).



**Figura 2.** Manifestações clínicas da doença de Chagas (Coura 2007).

### 1.5 - Interação do parasita com a célula hospedeira e invasão.

Muitos pesquisadores têm evidenciado os processos envolvidos na interação *Trypanosoma cruzi* - célula hospedeira e tem sido observado que várias moléculas de superfície do *T. cruzi* e das células hospedeiras possuem papel fundamental na capacidade de adesão e invasão do parasita, e são capazes de interferir em mecanismos de transdução de sinal da célula hospedeira (Burleigh e Woolsey, 2002). Vias de transdução de sinal conservadas relacionadas com a ativação do metabolismo de glicose, o consumo de energia, a fosforilação de proteínas, e atividade oxidativa têm um papel importante na relação parasita – hospedeiro.

Através do tratamento com tripsina, Andrews e colaboradores (1984) removeram a maioria das glicoproteínas de superfície de tripomastigotas de cultura, exceto duas glicoproteínas de 85 KDa e uma de 68 KDa, e demonstraram uma considerável diminuição da capacidade invasiva do parasita, sugerindo o envolvimento dessas moléculas no processo de invasão. Visando à caracterização das moléculas de superfície do *T. cruzi*, glicolipídios e glicoproteínas foram isolados e caracterizados em sua estrutura química. Uma característica comum a maior parte dessas moléculas é estarem ligadas à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Cardoso de Almeida e Heise, 1993). Entre os glicolipídios, os predominantes em *T. cruzi* são os glicoinositolfosfolipídios (GIPL). A função dos GIPL na biologia do *T. cruzi* ainda não está esclarecida, no entanto, por conterem componentes incomuns em sua estrutura, é possível que essas moléculas estejam envolvidas em processos de interação com a célula hospedeira, como um fator de virulência ou como um modulador da resposta imune do hospedeiro vertebrado (Dos Reis *et al.*, 2002).

Entre as glicoproteínas mais abundantes estão as sialoglicoproteínas, também denominadas moléculas semelhantes às mucinas. São glicoproteínas ancoradas à membrana do *T. cruzi* via âncora GPI e a principal característica é serem altamente O-glicosiladas (Serrano *et al* 1995). De maneira incomum, as mucinas de *T. cruzi* contêm resíduos de ácido siálico que não são sintetizados pelo parasita e sim transferidos de sialoglicoconjugados exógenos, através de uma reação catalisada por uma enzima única expressa na superfície do parasita,

denominada *trans*-sialidase (Previato *et al.*, 1985; Zingales *et al.*, 1987; Schenkman *et al.*, 1991).

Durante o processo de invasão das células hospedeiras por tripomastigotas metacíclicos e por tripomastigotas de cultura, vias de transdução de sinal são ativadas nos parasitas e nas células-alvo, levando a uma mobilização de  $Ca^{++}$  (Neira *et al.*, 2002). Para adesão celular, tripomastigotas metacíclicos ligam-se à superfície da célula hospedeira através de glicoproteínas, como a gp35/50 e a gp82, que são moléculas de sinalização que ativam a liberação de  $Ca^{++}$  e essas moléculas de sinalização podem estar envolvidas na maior capacidade de invasão da cepa CL do *T. cruzi* quando comparada com a cepa G (Ruiz *et al.*, 1998). Em cepa CL de *T. cruzi* que entra na célula hospedeira mediado por gp82, proteínas tirosina cinase assim como fosfolipase C dos parasitas são ativadas e o cálcio é liberado por compartimentos sensíveis a IP3. Em cepa G de *T. cruzi* que se liga a células alvo principalmente através de gp35/50, a via de sinalização que envolve adenilato ciclase parece ser estimulada, com a liberação de  $Ca^{++}$  do acidocalcissoma (Neira *et al.*, 2002). Além disso, a cepa G é dependente de sinais inibitórios mediados por uma gp90 específica de metacíclicos, que podem ser acionados tanto na célula hospedeira quanto no parasita (Ruiz *et al.*, 1998; Málaga e Yoshida 2001). O repertório de moléculas de tripomastigotas de cultura implicadas na invasão celular inclui glicoproteínas de superfície da família gp85, com os membros contendo sítios de ligação para laminina e citoqueratina 18, enzimas como a cruzipaina, *trans*-sialidase, e uma oligopeptidase B, que gera um agonista de  $Ca^{++}$  - a partir de uma molécula precursora (Yoshida 2006).

Estudos recentes mostraram que lipídios, especialmente domínios conhecidos como “lipid rafts”, também desempenham um papel importante no processo da interação entre os diferentes agentes patogênicos e as suas células hospedeiras (Duncan *et al.*, 2004; Van der Goot e Harder, 2001). “Lipid rafts” são regiões da membrana plasmática altamente especializada e enriquecidas não só por colesterol e esfingolipídios mas também por proteínas GPI-ancoradas, proteínas duplamente aciladas (por exemplo, a família Src tirosina cinases e subunidades  $G\alpha$  das proteínas G heterotrimericas), proteínas palmitoiladas ou

miristoiladas como flotilinas e gangliosídios GM1 (Van der Goot e Harder, 2001). Estes “rafts” de membrana são resistentes à solubilização com detergente e estão envolvidos em várias funções celulares, como transdução de sinal, triagem molecular e tráfego através da membrana (Lafont *et al* 1999).

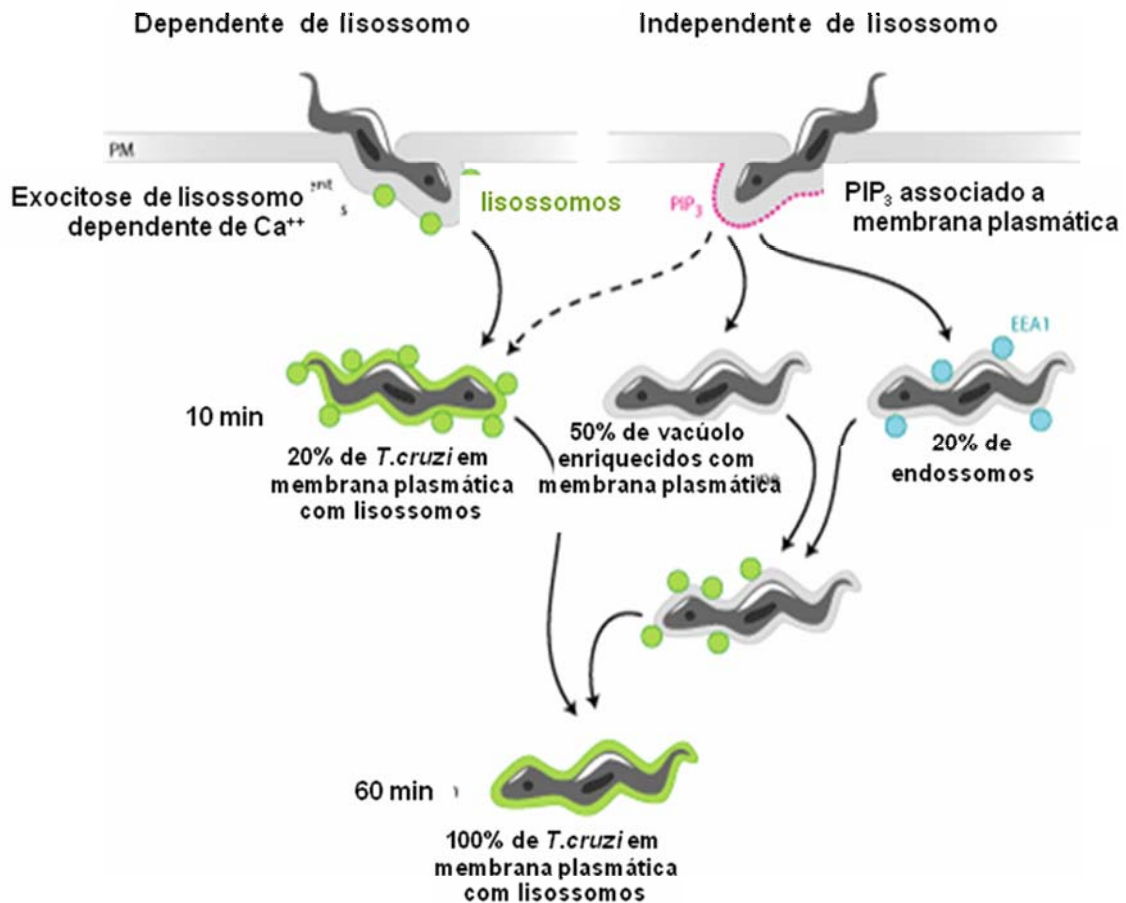
A participação de “rafts” de membrana durante o processo de invasão de formas tripomastigotas foi demonstrado em macrófagos (Barrias *et al.*, 2007) e em células não fagocíticas profissionais (Fernandes *et al.*, 2007).

Após a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira esse parasita intracelular se localiza no vacúolo parasitófora. Ao contrário da maioria dos patógenos intracelulares especializados em evitar o contato com o meio lisossomal da célula hospedeira o *T. cruzi* requer um pH baixo do ambiente lisossomal para iniciar sua saída para o citoplasma onde irá realizar seu ciclo replicativo na forma amastigota (Ley *et al.*, 1990). Assim, o tráfego e a permanência transiente do parasita dentro dos fagolisossomos da célula hospedeira são necessários para o estabelecimento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em células de mamíferos (Burleigh, 2005).

Duas formas de participação dos lisossomos no processo de internalização e estabelecimento da infecção são descritas (Figura 3) (Burleigh, 2005). O principal modelo (Figura 3, setas sólidas) ilustra dois modos independentes de entrada do *T. cruzi* em fagócitos não profissionais. A via dependente de lisossomo é dependente de  $Ca^{++}$ , e iniciada pela exocitose de lisossomos que se fundem à membrana plasmática, no local de invasão do parasita. Na via independente de lisossomo, os parasitas entram na célula através das invaginações da membrana plasmática que acumulam fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3), principal produto da classe de ativação da fosfatidilinositol cinase-3 (PI3K) (Figura 3). Independente da rota de entrada, todos os parasitas intracelulares direcionam-se para o compartimento lisossomal da célula hospedeira após 60 minutos de infecção da célula hospedeira.

Os dados revisados acima contestam fortemente uma estratégia para a invasão de *T. cruzi* baseada somente no recrutamento e fusão do lisossomo. Na verdade, muitos dos dados emergentes apoiam a idéia de que a fusão do lisossomo ocorre no final do processo de entrada do parasita na célula.

Claramente, experimentos adicionais são requeridos para elucidar essas questões importantes em um campo que está se tornando cada vez mais controverso (Burleigh, 2005).



**Figura 3.** Processo de invasão do *T. cruzi* em fagócitos não profissionais (Adaptado de Burleigh, 2005).



### 1.6 – Homeostase iônica e crescimento do *T. cruzi*

A capacidade de penetração do *T. cruzi* na célula hospedeira pode estar relacionada à sinalização mediada por glicoproteínas, assim como, a ativação da fosfolipase C (PLC). O IP<sub>3</sub> e o diacilglicerol, liberados a partir da ativação de PLC estão, respectivamente, envolvidos no controle da concentração de cálcio intracelular, através dos canais de cálcio do retículo endoplasmático, e da ativação de PKC (Yoshida *et al.*, 2000). Em mamíferos, enzimas como a Na<sup>+</sup>-ATPase, insensível a ouabaína e sensível a furosemida, e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase sensível a ouabaína, são dependentes das vias de sinalização que envolve a PKC (Rangel *et al.*, 2001).

Durante o seu ciclo de vida, sabe-se que o *T. cruzi* enfrenta bruscas variações no pH (que pode variar de 4.5 a 9) e concentrações iônicas extracelulares. A regulação do pH intracelular e a manutenção do equilíbrio osmótico e do potencial de membrana em resposta a estas condições variadas deve representar uma etapa crucial para garantir a sua sobrevivência (Gil, *et al.*, 2003). Este processo ocorre por coordenada ativação de diferentes vias de sinalização e transportadores de íons que permitem o crescimento do parasita (Einicker-Lamas *et al.*, 2000). Além disso, na maioria das células eucarióticas um potencial eletroquímico é mantido através da membrana plasmática por ação de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPases. Em *T. cruzi*, sabe-se que uma H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática presente em todas as formas do parasita tem atividade eletrogênica e foi diretamente associada à manutenção do potencial de membrana em formas epimastigotas (van der Heyden *et al.*, 1996). Entretanto, é bem provável que nos parasitas o potencial de membrana também seja regulado por transporte de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (van der Heyden e Docampo, 2002).

Desta forma, dois transportadores de Na<sup>+</sup>, ambos pertencentes à família de ATPases do tipo P, foram identificados em *T. cruzi* (Caruso-Neves *et al.*, 1998; Caruso-Neves *et al.*, 1999). Um dos transportadores de Na<sup>+</sup> da membrana plasmática é a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase sensível a ouabaína e ao K<sup>+</sup>. O outro transportador codificado pelo gene *TcENA* e, que é inibido por furosemida e insensível à ouabaína e a K<sup>+</sup> é a Na<sup>+</sup>-ATPase (Iizumi *et al.*, 2006; Caruso-Neves *et al.*, 1999)

Além disso, em epimastigotas da cepa CL14 do *T. cruzi* foi demonstrado que a inibição da Na<sup>+</sup>-ATPase por furosemida diminui a captação do *myo*-inositol que é essencial para o crescimento do parasita (Einiker-Lamas *et al.*, 2000). No entanto, os mecanismos de regulação desta enzima em *T. cruzi* ainda não são conhecidos.

Embora pouco se saiba sobre os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da homeostase do *T. cruzi*, foi demonstrado que proteína cinase C (PKC) desempenha um papel importante na modulação da via de crescimento do parasita, pelo menos em parte, pela modulação dos transportadores de soluto, tais como o cotransportador de *myo*-inositol (Einiker-Lamas *et al.*, 2000). Em células renais de mamíferos, Rangel e colaboradores (2001) demonstraram que a enzima Na<sup>+</sup>-ATPase insensível a ouabaina e sensível a furosemida é ativada pela fosforilação de PKC. Esse mecanismo pode ser similar em protozoários parasitas como o observado na ativação de (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase de *Leishmania amazonensis* podendo representar um importante mecanismo de regulação da homeostase iônica em protozoários parasitas, e um potencial alvo para drogas (Almeida-Amaral *et al.*, 2007).

Nesse contexto trabalhos recentes demonstraram que acidocalcisomas são organelas ácidas elétrons densas ricas em cálcio e polifosfatos sendo conservadas durante a evolução dos procariontes aos eucariotes. Os acidocalcisomas foram primeiramente descritos em espécies de tripanossomatídeos onde foram melhor caracterizados. Várias funções têm sido atribuídas aos acidocalcisomas entre elas o armazenamento de cátions e fósforo, o metabolismo de polifosfato, homeostase de cálcio, a manutenção da homeostase do pH intracelular e a osmoregulação (Docampo *et al.*, 1995; Scott *et al.* 1997; Urbina *et al.*, 1999; Scott e Docampo 2000; Ruiz e Docampo 2001; Seufferheld *et al.*, 2003). Essas características destacam a grande importância dessas organelas para o controle do meio celular, e por reunirem as características mencionadas acima, podem ser alvos para novos medicamentos (Moreno e Docampo 2003; Docampo *et al.*, 2005).

### **1.7 – Apresentações patológicas no modelo experimental da doença de Chagas em camundongo**

Na escolha do modelo experimental deve ser observada a susceptibilidade ou resistência da estirpe do camundongo à doença de Chagas. Os padrões de resistência e susceptibilidade à infecção, que são medidos pelas taxas de mortalidade, tempo de sobrevivência e níveis de parasitemia, dependem da relação entre a estirpe do camundongo e a amostra do parasita (Andrade *et al.*, 1985).

Um estudo detalhado comparando o comportamento de várias cepas do parasita em animais experimentais e que incluem o tropismo tissular, a morfologia de formas sangüíneas do parasita e alterações histopatológicas no curso da infecção permitiram agrupar os padrões de cepas do *T. cruzi* em três tipos fundamentais (Andrade *et al.*, 1974).

Nas infecções com cepas Tipo I observa-se até 10 dias após a infecção, parasitas nos macrófagos de órgãos como o baço, fígado, linfonodos e tecido conjuntivo (Andrade *et al.*, 1985). Na fase aguda ocorre mitotropismo, com lesões inflamatórias de miocárdio, músculo esquelético e músculo liso. Em amostras do Tipo II, que induz parasitemia entre 12 e 20 dias após a infecção, ocorre lesões principalmente no miocárdio com intenso processo de miocardite. Em menor proporção, ocorrem lesões de músculo esquelético e de músculo liso. Nas amostras Tipo III, como a cepa Colombiana, a parasitemia tem uma evolução lenta com níveis elevados no 30º dia, apresentando mitotropismo em todo o curso da infecção.

O modelo Balb/c (isogênico) é um dos modelos mais suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* e, portanto, vem sendo utilizado para a triagem inicial de drogas e de agentes imunomoduladores que aumentam a resistência à infecção. O modelo Balb/c-cepa Y foi muito estudado no Brasil e na França na década de 80 (Rossi *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 1985; Minoprio *et al.*, 1988; D' Império-Lima *et al.*, 1986; Russo *et al.*, 1989), da mesma maneira que o camundongo Swiss (não isogênico), por serem suscetíveis a diferentes amostras do parasita (Andrade, *et al.*, 1985) e ao contrário de outros modelos, não apresentam resistência relacionada ao sexo

(Luz *et al.*, 1995). Camundongos Swiss são muito utilizados em estudos que necessitam de um grande número de animais e visam à avaliação de sobrevivência, como por exemplo, na quimioterapia experimental (Gutteridge *et al.*, 1978). Para o estudo da infecção crônica da doença de Chagas os camundongos mais utilizados são: C57BL/6 e C57BL/10 (quando infectados com inóculos baixos), por possuírem resistência a maioria das cepas de *T. cruzi* (Postan *et al.*, 1987) e os camundongos C3H infectados com a cepa Colombiana (Kumar *et al.*, 1969). Estes dois modelos propiciam o estudo da miocardite chagásica crônica.

### **1.8 – Resposta imune à infecção pelo *T. cruzi***

Durante a fase aguda da doença de Chagas tem sido demonstrado o papel crucial de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e da produção de IFN- $\gamma$  como importantes elementos para o controle da replicação do parasito durante a fase aguda e a fase crônica da infecção (Brener e Gazzinelli, 1997; Lannes-Vieira, 2003; Martin e Tarleton, 2005; Miyahira, 2008).

Em vários sítios de infecção células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> necessitam de co-estimulação de moléculas CD28 através de moléculas CD80 e CD86 para uma ativação apropriada. Durante a infecção pelo *T. cruzi* camundongos deficientes de moléculas CD28 apresentam susceptibilidade à infecção com aumento da parasitemia e mortalidade (Dos Reis *et al.*, 2005; Miyahira, 2008). CTLA-4 é um receptor co-estimulatório negativo para CD80 e CD86. O bloqueio de CTLA-4 aumenta a produção de IFN- $\gamma$  e NO pelos esplenócitos e conseqüentemente aumenta a resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Outras moléculas como a IL10 e o TNF- $\alpha$  são de grande importância respectivamente para uma inibição ou ativação de células T (Dos Reis *et al.*, 2005; Miyahira, 2008).

Fuenmayor e colaboradores (2005) mostraram não haver diferenças quantitativas entre as sub-populações de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na miocardite aguda em pacientes chagásicos. Através da utilização de modelo experimental de camundongos C3H/HeJ infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, também demonstraram a prevalência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido cardíaco de animais

cronicamente infectados. Neste modelo, tanto as células T CD4<sup>+</sup> quanto as CD8<sup>+</sup> no tecido cardíaco expressam fenótipo de ativação, que se traduz por uma baixa expressão de L-selectina (CD62L) e alta expressão de LFA-1 e VLA-4 (CD62L<sup>low</sup>, LFA-1<sup>high</sup>, VLA-4<sup>high</sup>). Este fenótipo das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> contribui para o estabelecimento do processo inflamatório que gera a miocardite durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* (Lannes-Vieira, 2003).

Em estudos com a utilização da droga de escolha para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol, foi mostrado que o sistema imune aumenta a eficácia dessa droga (Murta *et al.*, 1999; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000). A terapia com IL-12 recombinante e IFN- $\gamma$  aumenta a eficácia do benzonidazol no tratamento de camundongos infectados com o *T. cruzi* (Michailowsky *et al.*, 1998) e esse resultados estão de acordo com estudos que demonstraram que pessoas que foram tratadas e curadas com benzonidazol têm uma maior produção de IFN- $\gamma$  do que aquelas que foram tratadas e não tiveram cura (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000). Em estudo onde foram utilizadas diferentes camundongos “knockout”, foi demonstrada a participação crucial do IFN- $\gamma$  no aumento da eficácia do benzonidazol no tratamento da infecção aguda pelo *T. cruzi* e também um parcial envolvimento de iNOS e TNF- $\alpha$  (Romanha *et al.*, 2002). De acordo com esses resultados faz-se necessário o estudo de novas drogas que possam agir diretamente sobre o parasita sem que haja a participação do sistema imune, para que possam ser eficazes no tratamento de pessoas chagásicas imunocomprometidas ou na fase crônica da doença.

### **1.9 Tratamento da doença de Chagas**

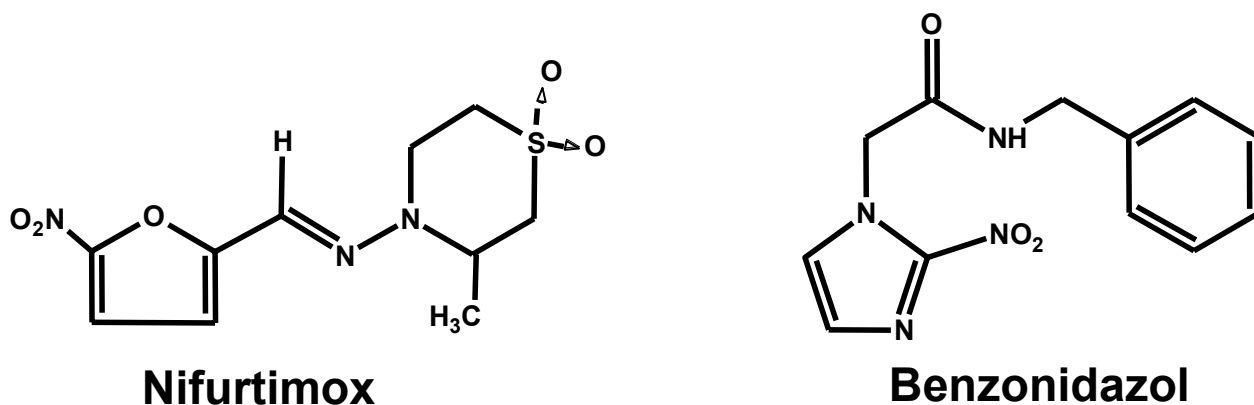
A persistência do parasita, juntamente com uma resposta imunitária desequilibrada que pode incluir reações autoimune, que sustentam respostas inflamatórias em tecidos infectados, são as principais causas das lesões observadas na doença de Chagas crônica (Tarleton 2001). Estes fatos indicam que a eliminação do *T. cruzi* de pacientes chagásicos pode ser um pré-requisito para impedir a evolução da doença e evitar as suas conseqüências irreversíveis que ocorrem a longo prazo. Infelizmente, apesar dos grandes avanços na

compreensão da biologia do *T. cruzi*, as únicas drogas atualmente disponíveis contra este parasita são aquelas que foram registradas a 21 anos atrás: nifurtimox e benzonidazol (Figura 4) (Croft et al., 2005). Estes compostos são ativos na fase aguda da doença de Chagas, com até 80% de eficácia o benzonidazol tem demonstrado ser eficiente no início da infecção crônica mas ineficiente na fase crônica já estabelecida (Sosa Estani et al 1998). O mecanismo de ação dessas drogas envolve a ação direta de radical nitroânion (metabólitos eletrofílicos) sobre moléculas suscetíveis, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, a geração de radicais livres de oxigênio e a diminuição da síntese de proteínas (Stoppani, 1999; Maya et al., 2007). O benzonidazol e o nifurtimox são parcialmente eficazes na forma aguda da infecção causada pelo *T. cruzi*, porém na fase crônica não é observada cura parasitológica (Stoppani, 1999). Os nitroderivados anti-*T. cruzi* têm demonstrado grande citotoxicidade e atividade mutagênica, teratogênica, carcinogênica e esterilizante (Stoppani, 1999). Os efeitos citotóxicos e genotóxicos parecem estar associados à ação dos nitroderivados que se ligam a regiões com alta densidade eletrônica em macromoléculas e DNA, após redução enzimática do grupo nitro e geração de radicais livres eletrofílicos, como os nitroânions, hidroxila, via oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a esses fatos o efeito tóxico da droga atinge o parasita e as células do hospedeiro mamífero (Lauria-Pires, et al., 2001).

O tratamento com nifurtimox é recomendado em 10-12 mg kg<sup>-1</sup> por dia de 30-60 dias, durante a fase aguda, e em 8-10 mg kg<sup>-1</sup> por dia durante 60-90 dias na fase crônica. O benzonidazol deve ser administrado a 7,5 mg kg<sup>-1</sup> por dia para as crianças durante 60 dias, e de 5 mg kg<sup>-1</sup> por dia para adultos durante 30-60 dias, durante a fase aguda e em 5 mg kg<sup>-1</sup> por dia durante 60 dias em doentes crônicos. Há agora um consenso geral de que o tratamento antiparasitário deve ser dado a todos os indivíduos soropositivos para reduzir ou eliminar a sua carga parasitária. No entanto, muitos médicos continuam a ter fortes reservas quanto à utilização do nifurtimox ou benznidazol em doentes crônicos devido ao risco desfavorável (Urbina e Docampo 2003).

Foi observado que dependendo da cepa de *T. cruzi* as drogas apresentam eficácias variadas durante o tratamento da infecção chagásica (Filard e Brener 1988; Neal e van Buere, 1988; Murta *et al.*, 1998). Os resultados obtidos mostraram que a resistência das diferentes amostras de *T. cruzi* não está relacionada às áreas geográficas de onde foram isoladas.

O nifurtimox, após vasta utilização no Brasil e em outros países da América do Sul, deixou de ser comercializado devido ao seu alto grau de toxicidade. Por isso, atualmente apenas o benzonidazol é utilizado no tratamento dessa doença no Brasil (Murta *et al.*, 1998).



**Figura 4:** Drogas utilizadas no tratamento da doença de Chaga na América do Sul

### 1.10 Drogas em teste para o tratamento da doença de Chagas

Embora a descoberta da doença de Chagas tenha ocorrido a quase 100 anos (Chagas, 1909), ainda não há drogas eficazes para todas as fases da doença. As drogas utilizadas são classificadas como (i) fármacos com atividade clínica reconhecida, como o nifurtimox e benzonidazol; (ii) drogas com atividade em modelos *in vivo* sem aplicação clínica efetiva: como o itraconazol e o alopurinol; (iii) drogas efetivas em modelos experimentais com utilidade clínica prevista, como peptídeos inibidores de cisteína-protease e fenotiazinas; e (iv) drogas efetivas sobre o *T. cruzi* em meio de cultura axênico e em cultura de células, como as O-naftoquinonas (Stoppani, 1999).

Atualmente, através de estudos bioquímicos, vem sendo possível a identificação de novos alvos quimioterápicos como o metabolismo de esteróis, as enzimas tripanotona redutase, cisteína protease, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerase, dihidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase (Docampo e Moreno, 2001; Rodriguez; 2001; Coura e de Castro 2002; Urbina e Docampo 2003).

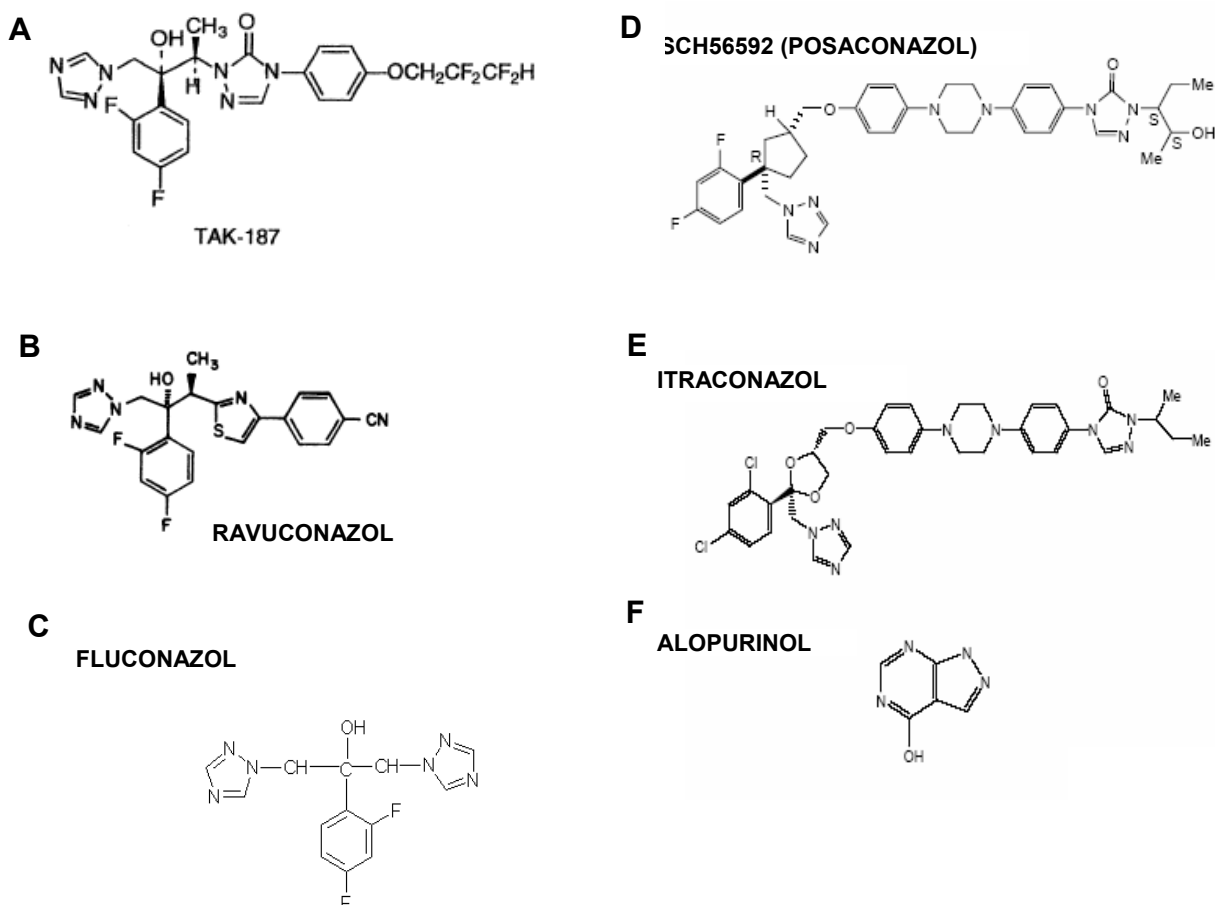
Apesar da grande quantidade de diferentes classes de compostos que apresentam atividade *in vitro* e *in vivo* sobre o *T. cruzi*, poucas drogas foram submetidos a ensaios clínicos desde a introdução do nifurtimox e do benzonidazol. Este fato ocorre em muitos casos devido à falta de forte indicação do efeito curativo, em relação ao efeito tóxico que são geralmente analisados somente em modelos *in vitro*. Entre as drogas com efeito já comprovado contra o *T. cruzi in vitro* e *in vivo* e que apresentam potencial para o tratamento da doença de Chagas podemos citar a TAK-187, o ravuconazol, o fluconazol, o posaconazol o itraconazol e o alopurinol (Figura 5), sendo que os últimos quatro já vem sendo utilizados em testes clínicos (Coura e de Castro, 2002)

O *T. cruzi*, assim como fungos, sintetiza ergosterol, mas não colesterol, e assim, neste parasita, etapas da biossíntese de esteróis que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos, têm sido intensamente estudadas como alvo quimioterápico. A TAK-187 (Urbina *et al.*, 2003b), o ravuconazol (Urbina *et al.*, 2003a), fluconazol e o itraconazol (Goad *et al.*, 1989), são inibidores da biossíntese de esteróis agindo sobre a enzima C14 $\alpha$ -esterol demetilase, assim como o posaconazol (SCH56592) (Molina *et al.*, 2000, Urbina *et al.*, 1998) que elevou a taxa de cura de camundongos infectados com cepas resistentes ao nifurtimox, benzonidazol e cetoconazol (Urbina *et al.*, 2003b; Urbina e Docampo 2003).

Purinas são essenciais para a síntese de nucleotídeos, porém, tripanossomatídeos, diferentemente dos hospedeiros vertebrados, apresentam um metabolismo para purinas totalmente distinto (Berens *et al.*, 1982), essas moléculas são capturadas da célula hospedeira. O alopurinol, que é um análogo da hipoxantina, atua como um substrato alternativo para a hipoxantina-guanina



fosforribosil transferase (HGPRT) e é incorporado no RNA. Esta incorporação leva à formação de nucleotídeos não fisiológicos que bloqueiam a síntese *de novo* de nucleotídeos a base de purina e também bloqueiam a síntese protéica.



**Figura 5.** Drogas potenciais para o tratamento da doença de Chagas. (Stoppani 1999; Urbina *et al.*, 2003a; Urbina *et al.*, 2003b; Urbina e Docampo 2003; Croft *et al* 2005)

### 1.11 Miltefosina

Análogos de lisofosfolípidios (LPAs), entre eles a miltefosina, compõem uma ampla classe de compostos metabolicamente estáveis, que foram desenvolvidos como agentes anti-câncer há mais de duas décadas (Kuhlencord *et al.*, 1992; Unger *et al.*, 1992; Wieder *et al.*, 1999), mas que também possuem potente e seletiva atividade antiparasitária. Especialmente contra *Leishmania spp.* e tripanosomatídeos parasitas, como o *Trypanosoma cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*. (de Castro *et al.*, 2004). Em estudos realizados com camundongos deficientes de células T (nude) (Murray, 2000), e camundongos deficientes em células T e B (*scid*) (Escobar *et al.*, 2001) infectados com *Leishmania donovani* foi observada a eficácia da miltefosina, demonstrando a ação dessa droga independente da ativação do sistema imune. (Murray e Delph-Etienne, 2000; Escobar *et al.*, 2001). Por causa de sua natureza química, LPAs têm uma interação potencial com uma variedade de estruturas sub-celulares e vias bioquímicas principalmente as membranas celulares (Wieder *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2004). No entanto, em células de mamíferos, LPAs induz inibição do crescimento e morte celular programada que está associada, na maioria dos casos, com um bloqueio da biossíntese de fosfatidilcolina (PC) em nível da fosfocolina citidiltransferase (CCT, via de Kennedy ), provavelmente devido a depressão da síntese de esfingomiélin (Hannun e Obeid, 1995).e ou através de um aumento dos níveis celulares de ceramida (Hampton and Morand, 1989). Embora em parasitas tripanosomatídeos muito menos informações estejam disponíveis, a inibição da biossíntese de PC por LPAs também foi documentada, mas, em nível de fosfatidiletanolamina N-metil-transferase (PEMT; via de Greenberg's) (Lira *et al.*, 2001). A maior atividade da LPAs como inibidores da biossíntese PC em parasitas do que em células de mamíferos, provavelmente devido a diferentes vias bioquímicas envolvidos nos dois tipos de celulares, poderia explicar a sua ação seletiva antiparasitária *in vivo* ( Urbina 1997; Urbina, 2006). Através de análise ultraestrutural nas formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com LPAs foi observado extensa formação de projeções de membrana

(“blebs”) na região flagelar indicando que a membrana parece ser o principal alvo desses compostos (Santa-Rita *et al.*, 2000; 2006).

Em células tumorais a miltefosina (Figura 6) tem como possíveis mecanismos de ação as alterações das composições de membrana, inibição da biossíntese de fosfolípidios, indução de diferenciação das células tumorais, efeitos na transdução de sinais tais como: inibição de proteína cinase C (PKC), fosfolipase C (PLC), inibição da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase e indução de apoptose (Brachwitz e Vollgraf, 1995; Urbina 2006).

A miltefosina demonstrou excelente atividade *in vitro* contra formas extra e intra-celulares de *Leishmania sp* (Croft *et al.* 1987; Lux *et al.*, 1996; Lux *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2002). Foi demonstrado que análogos de éter lipídios causam perturbações na biossíntese da âncora GPI (Lux *et al.*, 1996), interferem em enzimas envolvidas no metabolismo de acil-glicerofosforilcolinas e alquil-glicerofosforilcolinas (Lux *et al.*, 2000) e, semelhante às células tumorais, inibe a atividade de PKC (Lux *et al.*, 2000). Através da administração oral da miltefosina em camundongos infectados com *L. donovani* foi observado a potencialidade da utilização dessa droga para o tratamento da leishmaniose visceral (Kuhlencord *et al.*, 1992; Croft *et al.*, 1996; Sundar *et al.*, 1999; 2000). Um teste clínico de fase III que envolveu 299 pacientes (Herwaldt, 1999), foi concluído em 2002 onde 94% dos pacientes foram considerados curados (Sundar *et al.*, 2002).

Vários organismos, desde procariotos até os eucariotos mamíferos possuem mecanismos eficientes de resistência a quimioterápicos, como a degradação de enzimas ou a inativação de drogas (Davis, 1994). A maioria das células possui mediadores protéicos do transporte de drogas através da membrana, o que diminui a concentração intracelular da droga e conseqüentemente a toxicidade (Lewis, 1994; Borst e Ouellete, 1995; van Veen e Konings, 1997). Entre esses mediadores protéicos podemos citar a glicoproteína-P e a proteína MRP que são membros da superfamília de transportadores ABC que catalisam a expulsão de drogas com gasto de energia (Higgins, 1992). A superfamília de transportadores ABC (“ATP-Binding Cassette”) é uma das mais importantes famílias de transportadores de múltiplas drogas (Cole *et al.*, 1992). Atualmente as drogas

utilizadas para o tratamento da doença de Chagas, benzonidazol e nifurtimox, possuem efeito satisfatório apenas na fase aguda da doença e recentemente tem sido demonstrado que o benzonidazol tem efeito moderado no tratamento da doença crônica (Sosa Estani *et al* 1998). Porém cepas do *T. cruzi*, como a Colombiana e Y, apresentam-se respectivamente resistente e parcialmente resistente ao benzonidazol, mas em experimentos *in vitro* não apresentaram resistência a miltefosina (Saraiva *et al.*, 2002). Murta e colaboradores (2001) observaram que a resistência ao benzonidazol e nifurtimox, de diferentes amostras de *T. cruzi*, pertencentes aos zimodemas Z1, Z2 e ZB, não está associada à amplificação ou expressão de genes de glicoproteína-P. Como esta proteína vem sendo considerada como envolvida na resistência a múltiplas drogas (Cole *et. al.* 1992), provavelmente outros fatores, ainda desconhecidos, contribuem para esta resistência. Apesar desta observação, em *Leishmania tropica* foi observada uma resistência a miltefosina que era mediada pela super-expressão de uma glicoproteína-P (Perez-Victoria *et al.*, 2001). Em estudos mais recentes Perez-Victoria e colaboradores (2003) clonou um transportador putativo de miltefosina (LdMT) que foi parcialmente caracterizado como uma nova ATPase do tipo P de uma subfamília de translocases de aminofosfolípidios. Parasitas resistentes (*L. donovani* M-40R) e transfectados com LdMT reconquistaram sua sensibilidade à miltefosina e a edelfosina e a capacidade de transportar essas drogas para o seu interior assim como glicerofosfolípidios. Perez-Victoria e colaboradores (2003) também demonstraram que a super-expressão do gene *LdMT* em *Leishmania tarentolae*, uma espécie naturalmente resistente a miltefosina, aumentou a absorção da [<sup>14</sup>C] miltefosina pelo parasito, indicando que esta proteína age como uma translocase. Recentemente outra proteína LdRos3 envolvida com a captura de miltefosina foi descrita associada a LdMT, parecendo fazer parte da mesma maquinária de translocação que determina a sensibilidade da *Leishmania* a miltefosina (Perez-Victória *et al* 2006). Em células tumorais KB, também foi descrito um mecanismo de captação de alquilfosfolípidios dependente de uma fosfolípido translocase (Muñoz-Martínez *et al.*, 2008).

Embora os dados de resistência da *Leishmania* à miltefosina, possa contribuir de forma negativa para a utilização dessa droga, os resultados obtidos indicaram que a miltefosina tem se mostrado eficiente e, aceitavelmente tolerada no tratamento da leishmaniose visceral, cutânea e muco-cutânea (Fischer *et al.*, 2001; Murray, 2002). Recentemente a miltefosina foi lançada no mercado como a primeira droga via oral para o tratamento da leishmaniose, o Impavido<sup>R</sup> (Sindermann, *et al.*, 2004).

Em *T.cruzi* a miltefosina demonstrou ter efeito sobre todas as formas do parasita *in vitro* (Croft *et al.*, 1996; Saraiva *et al.*, 2002), provocou inibição da C-22 esterol dessaturase e da biossíntese de fosfatidilcolina (Lira *et al.*, 2001). Demonstrou também atividade supressiva na parasitemia de camundongos infectados (Croft *et al.*, 1996; Saraiva *et al.*, 2002) e em experimentos *in vitro* demonstrou ser igualmente eficiente contra as formas epimastigotas e amastigotas das cepas Y (parcialmente resistente) e colombiana (resistente) (Saraiva, *et al.*, 2002).

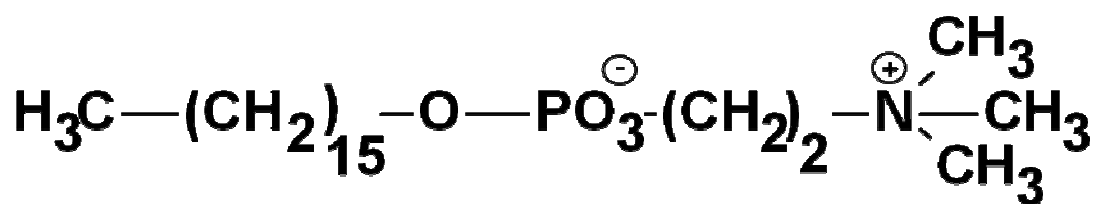


Figura 6. 1-O-hexadecilfosfocolina (miltefosina)

## 2 – OBJETIVOS

- Verificar o mecanismo de ação da miltefosina sobre a inibição do crescimento do *Trypanosoma cruzi* com especial atenção as vias de sinalização envolvidas nesse processo, avaliando: (i) a regulação da Na<sup>+</sup>-ATPase do *T. cruzi* epimastigota (cepa Y) pela miltefosina e PKC, e (ii) uma possível ligação entre os efeitos da miltefosina sobre a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase e da PKC.
- Avaliar a eficácia da miltefosina em comparação ao benzonidazol no tratamento de camundongos Balb/c (isogênico) infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, comparando dados de: (i) parasitemia, (ii) bioquímica sérica para a enzima creatina quinase (lesões cardíacas), (iii) histopatologia e (iv) imunohistoquímica.
- Analisar através de citometria de fluxo as características das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço e do infiltrado inflamatório do coração e os possíveis efeitos imunomodulatórios da miltefosina e do benzonidazol durante a infecção aguda.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – *Materiais*

Adenosina trifosfato (sal de Magnésio; Mg-ATP), ouabaina, furosemida, cloreto de sódio, cloreto de potássio, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), etilenoglicol bis(éter 2-aminoetil)- ácido tetracético (EGTA), *N*-2-hidroxiethylpiperazina *N*'-2- ácido etanosulfônico (HEPES), tris (trishidroximetil)-aminometano (Tris), anticorpo policlonal contra uma sequência consenso (Ac 543–549) de PKC de coelho contra (IgG de camundongo biotilado), extravidina peroxidase, Colagenase tipo IV hemina, albumina de soro bovino (BSA), histona II-S, calfofina C, RPMI, 12-meristato 13-acetato forbol éster (PMA), poli-L-lisina e deoxicolato de sódio foram comprados da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Imunoglobulina G (IgG) anti-rato biotilado, avidina e biotina foram adquiridos da VECTOR (Burlingame, CA, EUA). Miltefosina ou hexadecilfosfocolina (HePC), foi gentilmente fornecida por Zentaris (Frankfurt, Alemanha). Solução de HePC foi diariamente preparada em água deionizada (Millipore). Tissue-Tek foi adquirido da Sakura, Japan. Sacarose CK-MB (GRANUTEST<sup>R</sup> 2.5) e Hematoxilina de Mayer foram adquiridas da MERCK-Brasil. Ácido fólico, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, e carvão ativado foram obtidos da Vetec, Rio de Janeiro, Brasil. Nitrocelulose foi adquirida da Millipore Brasil. Anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), diaminobenzidina (DAB), reagente de quimioluminescência (Kit ECL Plus) e Percoll foram comprados da Amersham Biosciences, Sunnyvale, Califórnia. Tween 20 foi obtido da Reagen, Rio de Janeiro, Brasil. Anticorpos monoclonais Anti-CD8 (aloficocianina (APC)), Anti-CD4 (complexo proteico peridina-clorofila (PerCP)), Anti-CD3 (ficoeritrina (PE)), Anti CD62L (isotiocianato (FITC)), Anti LFA-1(FITC) e Anti-CD2 (FITC).foram obtidos da PHARMIGEM, (San Diego, CA, EUA) e o anticorpo anti-amastigota ( $\alpha$ -ASP-2) foi gentilmente cedido pelo Dr. Maurício Martins Rodrigues do departamento de Imunologia e Parasitologia da UNIFESP, São Paulo. Soro Fetal Bovino (SFB) foi obtido da SEROMED, Brasil, infuso de cérebro e coração (BHI) da Difco, Detroi, MI, EUA) e [<sup>32</sup>Pi]Pi do Instituto Brasileiro de energética e Investigação Nuclear,

São Paulo, Brasil. [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ i] ATP foi sintetizado, de acordo com os procedimentos descritos por Maia e colaboradores. (1983).

### **3.2 - Mecanismos de Ação da Miltefosina**

#### **3.2.1 – Parasitos e condições de cultivo**

Cepa de *T. cruzi* Y, parcialmente resistentes ao benzonidazol (Filardi e Brener, 1987; Murta, *et al.*, 1998) foi adquirida da coleção de cultura da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro).

**3.2.1.1 *T. cruzi* forma epimastigota** - As células foram mantidas a 28°C, em tubos com tampa de rosca, contendo 5mL de meio com a seguinte composição (g/L): BHI (37 g), hemina (0.01g) e ácido fólico (0.02g), suplementado com 5% de SFB. Soluções estoque de hemina (10mg/mL) e ácido fólico (20mg/mL) foram preparados em hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M. Para a obtenção de células em quantidade suficiente para a preparação da fração enriquecida de membrana plasmática, 2,5 mL de cultivo de manutenção de epimastigotas foram transferidos para 25 mL de meio de cultura em frasco erlenmeyer e 250 mL do mesmo meio em frasco Erlenmeyer de 1000mL. As células foram cultivadas a 28°C por 5 dias, sob agitação constante de 80 rpm, em agitador orbital Gio Gyrotory, New Brunswick Scientific (Edison, EUA).

#### **3.2.1.2 *T. cruzi* forma tripomastigota**

Os tripomastigotas sangüíneos foram mantidos por passagens semanais em camundongos BALB/c (obtidos da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro). Para a manutenção da infecção o sangue com tripomastigotas foi coletado dos camundongos previamente infectados com o *T. cruzi* cepa Y, através de punção cardíaca. Posteriormente o sangue foi colocado na presença de anti-coagulante (liquemine 500 UI/mL de sangue) e centrifugado (1000g por 5 minutos), para a separação das hemácias. As formas tripomastigotas foram



obtidas após centrifugação (2000g por 10 minutos). Os parasitas foram resuspensores em RPMI, quantificados e o inoculo foi ajustado para  $10^5$  parasitas/camundongo. Para o procedimento experimental foi realizado o mesmo processo de coleta do parasito e a infecção dos animais foi realizada por via intraperitoneal com um inoculo de  $10^3$  tripomastigotas/camundongo. As células foram obtidas a partir de punção cardíaca dos camundongos. O sangue foi colocado na presença de anti-coagulante (liquemine (10 $\mu$ L)/sangue (100 $\mu$ L)), e os tripomastigotas foram utilizados para ensaios experimentais *in vivo*.

### **3.2.2 – Fração enriquecida de membrana plasmática (FM) de *T.cruzi* epimastigota**

O preparo da fração celular enriquecida de membrana plasmática (FEMP) foi realizado a partir de 1L de cultura ( $1 \times 10^8$ /mL) de formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. Os parasitos foram coletados através de centrifugação de 5140 g / 10 minuto a 4°C, e lavados em solução de EDTA 1mM, Tris 25mM e Sacarose 250mM, pH 7.4 (STE) e lisados mecanicamente (maceração), após adição de nitrogênio líquido e o lisado celular lavado com STE. A suspensão resultante foi submetida à nova centrifugação (1500 g /10 minutos a 4°C) para a remoção do núcleo e de células não lisadas. O sobrenadante obtido após esta centrifugação foi submetido à centrifugação a 48200 g /30 minutos 4°C para a obtenção de uma fração enriquecida com membrana plasmática. A fração enriquecida de membrana foi suspensa em STE para uma concentração de 20-26mg/mL e dividida em alíquotas que foram estocadas a 80°C. Para as centrifugações foi utilizada a centrífuga refrigerada Sorval modelo RC-5B. A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As FM forma estocadas a -80°C

### **3.2.3 - Isolamento da membrana baso lateral (MBL) de rim de porco**

As preparações de homogeneizado de córtex e de membrana basolateral de túbulo proximal foram feitas a partir de rins de porcos adultos. Os rins foram removidos imediatamente após a morte dos animais e mantidos em solução gelada contendo (em mM): sacarose 250, HEPES-Tris (pH 7,6) 10, EDTA 2 e PMSF 1. Fatias bem finas de córtex externo foram removidas com bisturi. Após a dissecação, as fatias foram homogeneizadas com pistilo de teflon na mesma solução com homogeneizador do tipo potter.

O homogeneizado foi centrifugado a 1500g, por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga SCR20B, usando o rotor RPR12-2 (Hitachi). Após a centrifugação descartou-se o precipitado e o sobrenadante foi coletado, parte deste homogeneizado foi separado e estocado a -4°C. O restante sofreu uma série de centrifugações para isolamento da fração enriquecida em membrana basolateral. Inicialmente, o homogeneizado foi centrifugado a 13000g, por 44 minutos, a 4°C, na ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 45Ti. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, sendo mantido o sedimento constituído por três camadas. A camada mais externa deste sedimento triplo, com cor esbranquiçada e textura macia (camada “fluffy”), foi ressuspensa, através de movimentos manuais circulares, em 4,0ml de solução contendo: sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, PMSF 1 mM. À suspensão obtida, correspondente à fração bruta de membranas plasmáticas, foi adicionado Percoll 12% (v/v), sendo o volume final de 52,0 ml ajustado com a mesma solução. A suspensão final foi homogeneizada por dez vezes e centrifugada a 40000g, por 1 hora e 6 minutos, a 4°C, em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 70Ti, para a formação do gradiente de densidade de Percoll e conseqüente separação das diferentes frações de membranas contidas na porção bruta de membranas plasmáticas (Boumendil-Podevin *et al.*, 1983). A fração de membrana basolateral foi, então, aspirada e homogeneizada por dez vezes com homogeneizador do tipo potter com pistilo de teflon e centrifugada por 60 minutos a 200000g em centrífuga Hitachi - Himac, modelo CP70 (Tóquio, Japão) utilizando rotor 90 Ti Beckman (Califórnia, USA), para a sedimentação do Percoll (Sacktor *et al.*, 1981). A fração de membrana

basolateral purificada foi ressuspensa em sacarose 250mM atingindo a concentração final entre 5-10mg de proteína.ml<sup>-1</sup> e estocada a -4°C. A atividade específica da (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase, um marcador de membrana basolateral, foi de 220,6 ± 20,3nmol Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, correspondente a um enriquecimento de 8 vezes, quando comparada à atividade medida em homogeneizado de córtex renal.

### **3.2.4 - Verificação da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase da FM do *T. cruzi* na forma de epimastigotas e MBL de rim de porco**

A atividade Na<sup>+</sup>-ATPase foi determinada de acordo com as descrições de Grubmeyer e Penefsky (1981). Composição do meio reacional: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP-Na<sup>+</sup>, 120 mM NaCl, 20 mM HEPES-tris (HEPES 0,5 M e Tris 2 M pH - 7.0), 1 mM ouabaína, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. A reação foi iniciada pela adição do meio reacional a fração de membrana com uma concentração final de 2.0 mg/mL de proteína a 37°C e parada após 30 minutos através da adição de uma suspensão de 50% de carvão ativado e 0.1 M de HCl. A liberação de [<sup>32</sup>P]Pi foi medida em uma alíquota do sobrenadante obtido após centrifugação das amostras durante 5 min a 2000 rpm em centrífuga clínica. A radioatividade foi quantificada por cintilação líquida contada em um aparelho Packard Tri-Carb 2100 TR, (Hewlett-Packard, São Paulo, Brasil). A hidrólise espontânea de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP foi quantificada simultaneamente em tubos em que a proteína (FEMP de epimastigota) foi acrescentada após o ácido. A atividade Na<sup>+</sup>-ATPase, expressa em nmoles Pi mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, foi calculada através da diferença entre os valores da atividade ATPase na presença e na ausência de 2 mM de furosemida. Todas as reações foram realizadas na presença de 1mM de ouabaína e na ausência de KCl.

### **3.2.5 Efeito da miltefosina, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, e DOC sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase**

Nesses ensaios a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase foi determinada na ausência ou presença de doses crescentes de NaCl (20-120 mM) e ou miltefosina (0.0003-0.3 mg/mL) ou de uma dose de miltefosina capaz de inibir 50% da atividade máxima da Na<sup>+</sup>-ATPase (0.015mg/mL). Para verificar a reversibilidade do efeito da miltefosina sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase a fração de membrana de epimastigotas foi

incubada com a droga (0.015mg/mL) e posteriormente diluída 40 vezes na ausência ou presença da droga. Para a análise da atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase na presença ou ausência de cálcio, em solução tampão Ca / EGTA, o  $\text{Ca}^{++}$  livre foi calculado utilizando um programa de informática que leva em conta as diferentes espécies envolvidas no equilíbrio entre EGTA,  $\text{Ca}^{++}$ , ATP,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{H}^+$ , fosfoenolpiruvato, e Pi, e a influência da força iônica sobre a associação constante de Ca / EGTA (Vieyra *et al.*, 1986). A atividade da enzima também foi estimada na ausência ou presença de deoxicolato de sódio 0,1%.

### **3.2.6 – Efeitos da furosemida (inibidor da $\text{Na}^+$ -ATPase) no crescimento do T. cruzi**

Epimastigotas ( $1 \times 10^5$ /mL) foram cultivados, como descrito anteriormente, na ausência ou presença de quantidades crescentes de furosemida (0.5 - 2 mM) em um volume final de 1 mL em placas de 24 poços (Corning, Corning, NY). A viabilidade do parasito foi analisada através da observação da motilidade e morfologia, e o número de parasitos foi determinado diariamente por contagem direta com uma câmara de Neubauer.

### **3.2.7 - Verificação da atividade $\text{Na}^+$ -ATPase do T cruzi “dependente” de PKC**

A atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase foi determinada como descrito no item 3.2.4 em meio reacional contendo PMA ( $10^{-12}$  M) (ativador da PKC), ou calfostina ( $10^{-8}$  M) (inibidor da PKC), miltefosina (0.015 mg/mL), PMA + miltefosina, ou calfostina + miltefosina (Caruso-Neves *et al.*, 1998).

### **3.2.8 - Immunoblotting**

As proteínas da FEMP foram aplicadas em um gel de poliacrilamida (7,5%) na presença de SDS (Laemmli, 1970) e posteriormente foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através de eletrotransferência. A membrana foi incubada em solução de bloqueio (Tris-HCl 20mM, TBS e NaCl 200mM) (pH-7,6) contendo BSA 5% durante 1 h em agitação leve para fazer o bloqueio contra ligações não específicas. Após este processo a membrana foi lavada com TBS-T

(TBS + 0,1%Tween 20) por 10 minutos e posteriormente incubada com TBS-T contendo anticorpo primário anti-PKC *consensus* (1:200) durante 1 h. A membrana foi então lavada com TBS-T e depois foi adicionado anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (1:2000) também em TBS-T por 1 h. Após duas lavagens de 10 minutos cada em TBS-T a detecção foi realizada por quimioluminescência (ECL PLUS) e a revelação feita através da utilização de filme BioMax MR.

### **3.2.9 - Verificação da atividade PKC**

Composição do meio reacional padrão: meio reacional 1 (MRC1): 4mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM HEPES-TRIS (pH-7,0), 1,5mg/mL Histona. Meio reacional 2 (MRC2): ATP-Na<sup>+</sup> 10μM, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>Pi] ATP (10<sup>7</sup>cpm/nmol). As atividades da proteína cinase C (PKC) expressas em nmoles Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, foram calculadas pela diferença entre os valores da atividade obtidos na presença ou ausência de calfostina 10<sup>-8</sup>(inibidor PKC). O estímulo de PKC foi obtido pela presença de PMA 10<sup>-12</sup> (ativador da PKC). Para isso, essas substâncias foram adicionadas ao meio reacional contendo MRC1 e a proteína (FM) (0,7mg/mL). A reação se inicia com a adição do MRC2 e é interrompida através da utilização de ácido tricloroacético (40%). Uma alíquota de 100μL é adicionada a uma membrana de nitrocelulose (0.45μm) e esta é lavada seqüencialmente com ácido tricloroacético 20% e tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) (0,1M/pH-7,0) e é filtrada a vácuo (Feschenko e Sweadner, 1994).

## **3.3 - Verificação da ação da miltefosina (ensaios *in vivo*)**

### **3.3.1 - Parasitos e infecção**

Os parasitos na forma tripomastigota sanguínea foram mantidos através de passagens semanais em camundongos BALB/c com inóculo intraperitonealmente de 10<sup>5</sup> parasitos por animal. Para a utilização desses parasitos o sangue dos animais previamente infectados foram coletados por punção cardíaca e um novo inóculo foi ajustado para 10<sup>3</sup> parasitos/100μL após contagem em Câmara de Neubauer.

### **3.3.2 - Tratamento**

Um total de 32 camundongos BALB/c (machos com 8 semanas de idade e ~20g) por experimento, inoculados ou não com tripomastigotas sangüíneos ( $10^3$ ) cepa Y, foram separados em quatro grupos de 8 animais: um grupo sem infecção e tratamento, um grupo infectado sem tratamento e dois grupos que após a inoculação dos tripomastigotas foram tratados via oral durante 15 dias consecutivos sendo um grupo tratado com 0.1 mL/dia de miltefosina (6,25 mg/mL-25mg/Kg) e outro grupo com 0.1mL de benzonidazol (25mg/mL-100mg/Kg). Os camundongos foram sacrificados no décimo quinto dia após a infecção (fase aguda) e tiveram o coração extraído para análise histopatológica, imunohistoquímica e imunocitoquímica (citometria de fluxo) e o baço extraído para análise imunocitoquímica.

### **3.3.3 - Parasitemia**

Após o 5° dia de infecção o acompanhamento do número de parasitos circulantes no sangue dos camundongos BALB/c foi realizado através da quantificação do número de parasitos/campo microscópico, observados por toda área da lamínula. Foram utilizadas lamínulas de  $400 \mu\text{m}^2$  e foi utilizada objetiva com aumento de 400x. A área do campo microscópico foi de  $0.159\text{mm}^2$  e o volume de sangue utilizado foi de  $5\mu\text{L}$  (Araujo-Jorge e de Castro, 2000).

### **3.3.4 - Histopatologia**

Os corações foram coletados de camundongos BALB/c infectados e sacrificados no 15° dia após a infecção, e cortados em sentido longitudinal para observação dos ventrículos e átrios. As amostras foram imersas em Tissue-Tek e congeladas em  $\text{N}_2$  líquido. Foram obtidos cortes ao criostato, de  $4 \mu\text{m}$ , que após fixação em formaldeído a 10% foram coradas pela técnica da hematoxilina eosina (HE), para a avaliação de parâmetros parasitológicos e inflamatórios. A avaliação por histomorfometria foi feita através da realização de microfotografias obtidas em sistema de análise de imagem (IMAGEPRO PLUS 5.0 da Media Cybernetics, USA). Imagens digitalizadas, de alta qualidade ( $2048 \times 1536 \text{ pixels buffer}$ ) foram

obtidas (10 imagens/animal) utilizando a lente objetiva de 40x. Para a contagem dos focos inflamatórios, considerados como presença de  $\geq 10$  células de infiltrado inflamatório/campo. Para a contagem do número de ninhos de amastigotas e número de parasitas por ninho, foram capturadas imagens de áreas contendo ninhos, de forma aleatória. A quantificação foi feita após análise de todos os campos microscópicos de 2 a 3 cortes de tecidos em 4 animais por ponto, pelo menos 400 campos/ponto (1 campo = 0,196 mm<sup>2</sup>).

### **3.3.5 – Imunohistoquímica – Detecção de células TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e antígenos da formas amastigota de T. cruzi**

Os corações extraídos dos camundongos BALB/c foram impregnados com Tissue-Tek e congelados foram também utilizados para a detecção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. As secções de 4  $\mu$ m foram colocadas em lâmina contendo fina camada de poli-L-lisina para melhor adesão. Os cortes foram fixados com acetona gelada durante 15 minutos e posteriormente lavados em PBS (tampão fosfato salino) (pH=7,6). A peroxidase endógena foi inibida com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol durante 15 minutos, e o bloqueio das ligações inespecíficas com no tecido foi feito com PBS-BSA 10% e leite Molico desnatado 8% durante 1 hora. Os anticorpos primários anti-TCD4<sup>+</sup> e anti-TCD8<sup>+</sup> de camundongo foram diluídos (1:100) em PBS+BSA 3%, e soro normal de cabra 1% e foram adicionados ao tecido overnight em câmara úmida a 4°C. O anticorpo secundário (anti-rato biotinilado) foi diluído (1:50) em PBS+BSA1% e a incubação com esse anticorpo foi de 1 hora. Após esta etapa foi adicionado o complexo streptavidina-peroxidase (1:30) durante 30 minutos e posteriormente foi utilizada a diaminobenzidina (DAB) (durante ~5 minutos a temperatura ambiente para a revelação. Finalmente o tecido foi contracorado com hematoxilina de Mayer. Os controles negativos das reações foram realizados incubando-se os cortes com soro não imune de rato 1%. Para a detecção do antígeno de amastigotas foi utilizado o mesmo método que para as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e o anticorpo primário anti-amastigota ( $\alpha$ -ASP-2) de camundongo foi diluído (1:10) em PBS+BSA 3%, leite molico 2%, soro normal de cabra 1% e soro normal de camundongo 1%.

### **3.3.6 - Coleta e marcação de células inflamatórias para citometria de fluxo**

Para o isolamento de leucócitos infiltrantes, os corações de 8 animais infectados foram coletados no 15º dia após infecção, cortados em fragmentos de 1 a 2 mm em PBS a 4°C e passados por diversos ciclos de lavagem para evitar qualquer contaminação por células do sangue. Os fragmentos foram submetidos a cinco ciclos de digestão enzimática de 20 minutos em banho-maria a 37°C em solução de 0,2% de colagenase tipo IV ( ) em meio RPMI. As células liberadas na suspensão foram centrifugadas 1000g por 10 minutos e transferidas para meio RPMI a 4°C suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e lavadas com RPMI 2x. Após esta etapa as células foram incubadas com 5% de soro de carneiro inativado (5% em RPMI) por 15 minutos, no gelo, para bloqueio de receptores para a porção Fc de imunoglobulinas G (FcγR). Para a marcação de superfície as células foram lavadas em meio RPMI com 10% SFB seguida de incubação. Os anticorpos monoclonais, previamente titulados, foram adicionados e foi feita a incubação no gelo por 30 minutos (Dos Santos, 2001). Todas as amostras foram lavadas em meio com 10% de SFB e fixadas em PBS contendo 2% de paraformaldeído. Após a marcação extra-celular, as células foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton e Dieckson) num total de 10.000 eventos, e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através da marcação fenotípica desejada para os linfócitos T (CD3). Os dados foram analisados no programa WinMDI versão # 2.8. Para esses experimentos os seguintes anticorpos foram utilizados: Anti-CD8 (APC) - 1: 200, Anti-CD4 (PerCP) - 1:200, Anti-CD3 (PE) - 1:100, Anti CD62L (FITC) - 1:100), Anti LFA-1(FITC-1:100) e Anti-CD2 (FITC-1:100).

### **3.3.7 - Bioquímica sérica**

A dosagem da atividade sérica da enzima creatina quinase (CK) isotipo cardíaco (CK-MB) foi utilizada como indicativo da destruição de fibras cardíacas (de Souza *et al.*, 2000). A enzima catalisa a fosforilação da creatina gerando fosfocreatina e ADP além de outros produtos finais como D-ribose-5-



fosfato, CO<sub>2</sub>, e NADPH. O aumento dos níveis de NADPH pode ser determinado fotometricamente e é diretamente proporcional à atividade da enzima. As leituras foram feitas com 5 µl de plasma dos animais normais, infectados e submetidos ou não ao tratamento com benzonidazol ou miltefosina coletados no 15º dia após infecção, mais 125 µl do reagente de trabalho (CK-MB) fornecido pelo fabricante (Merck Labs). As amostras foram mantidas por 4 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram feitas 7 leituras sucessivas com intervalo de 1 minuto em espectrofotômetro de placa a 340 nm (Molecular Device – VERSAmax microplate reader). Estes valores de absorvância referentes à leitura de NADPH foram expressos como diferenças de leitura a cada minuto (DeltaE/min) (de Souza *et al.*, 2000).

### **3.4 – Análise estatística dos dados**

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão. Cada dado experimental (n) corresponde aos resultados obtidos a partir de diferentes preparações enriquecidas de membrana ou diferentes grupos experimentais de camundongos BALB/c. As médias foram comparadas por análise de variância (one-way ANOVA), levando em conta o tratamento dos grupos experimentais. O tamanho das diferenças foi avaliado utilizando os vários testes comparativos de Bonferroni. Um valor de *P* menor que 0,05 foi considerado significativo. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, *GraphPad Prism* versão 4.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA)

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Possíveis mecanismos de ação da miltefosina: estudos in vitro

Os principais objetivos desse capítulo foram caracterizar a atividade da adenosina trifosfatase ativada por sódio do *T. cruzi*, verificar a ação da miltefosina nas atividades  $\text{Na}^+$ -ATPase e PKC, e verificar se existe alguma relação interligando as atividades da  $\text{Na}^+$ -ATPase e PKC no parasita. Em estudos preliminares já havíamos demonstrado que a  $\text{Na}^+$ -ATPase do parasito era um alvo para a ação da miltefosina, uma vez que a droga foi capaz de inibir a enzima de forma dose-dependente, e de maneira, aparentemente, reversível. Porém, tanto o mecanismo de inibição quanto a real importância da inibição da  $\text{Na}^+$ -ATPase para o crescimento e manutenção da viabilidade celular do *T. cruzi* ainda permanecem desconhecidos.

#### 4.1.1 Papel da $\text{Na}^+$ -ATPase no crescimento do *T. cruzi*

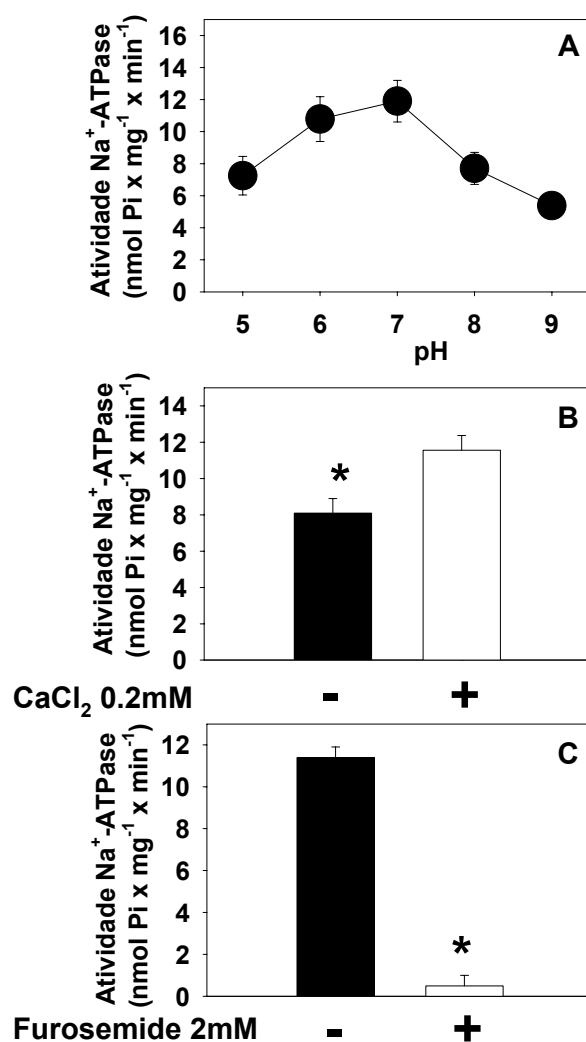
Até o momento duas bombas transportadoras de sódio foram descritas no *T. cruzi*: a  $(\text{Na}^++\text{K}^+)$  ATPase sensível a ouabaína (Caruso-Neves *et al.*, 1998) e a  $\text{Na}^+$ -ATPase insensível a ouabaína e sensível a furosemida (Caruso-Neves *et al.*, 1999). Embora tenha sido demonstrado que as diferentes isoformas de  $(\text{Na}^++\text{K}^+)$  ATPase apresentam também diferentes sensibilidades para a ouabaína (Blanco e Mercer, 1998), sabe-se que 1mM da droga é suficiente para inibir completamente todas as isoformas desta enzima. Por esse motivo todos os experimentos a seguir foram realizados na presença de 1mM de ouabaína para descartar qualquer contribuição da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)$  ATPase nas medidas das atividades ATPásicas estimuladas por sódio.

Nos estudos realizados no presente trabalho, foi observado que uma fração enriquecida de membrana plasmática (FM) obtida por centrifugação diferencial após lise mecânica de epimastigotas concentrou em 4x a atividade estimulada por sódio ( $15.9 \pm 2.1 \text{ nmol Pi mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) quando comparada com a atividade observada no homogenato inicial ( $3.8 \pm 0.98 \text{ nmol Pi mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). A atividade verificada na fração citosólica remanescente foi praticamente nula ( $0.29 \pm 0.15 \text{ nmol}$

Pi  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), corroborando com os dados da literatura de que a  $\text{Na}^+$ -ATPase encontra-se predominantemente associada a membrana plasmática do parasito.

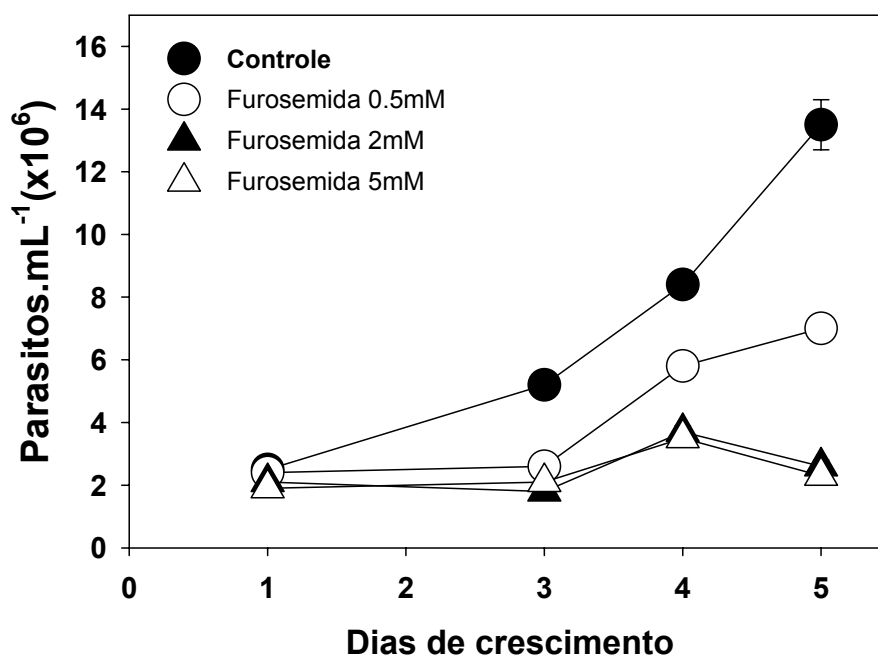
Com o objetivo de melhor caracterizar a  $\text{Na}^+$ -ATPase do *T. cruzi*, as FM de epimastigotas foram ensaiadas em diferentes condições de pH, na ausência ou presença de  $\text{Ca}^{++}$  e furosemida, e os resultados estão apresentados na Figura 7.

A atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase dependente de pH revela uma curva típica com um pH ótimo de 7,0 (Figura 7A), e essa atividade enzimática é maior em meio ácido do que em meio alcalino, o que pode representar uma importante adaptação da enzima ao ciclo de vida do parasito. Como observado em células de animais vertebrados (Marin *et al.*, 1985; Caruso-Neves *et al.*, 2002), a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase insensível a ouabaina de formas epimastigotas é ativada por  $\text{Ca}^{++}$  uma vez que a atividade dessa enzima é inibida em aproximadamente 33% quando o  $\text{Ca}^{++}$  é removido por meio da adição de 1mM de EGTA (Figura 7B). Além disso, como já observado anteriormente com a atividade ensaiada em homogenato total do clone CL14 do *T. cruzi* epimastigota (Caruso-Neves *et al.*, 1999), a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase insensível a ouabaina foi completamente inibida por 2mM de furosemida (Figura 7C). Estes resultados sugerem que a  $\text{Na}^+$ -ATPase insensível a ouabaina pode ser uma excelente ferramenta para identificar a presença e o papel das  $\text{Na}^+$ -ATPases insensíveis a ouabaina em diferentes microorganismos, inclusive o *T. cruzi*.



**Figura 7.** Caracterização da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase de formas epimastigotas do *T. cruzi*. A atividade Na<sup>+</sup>-ATPase em uma fração enriquecida de membrana de epimastigotas foi medida em diferentes pHs (A) e na ausência (-) ou presença (+) de 0,2 mM Ca<sup>++</sup> (B), ou 2 mM furosemida (C). Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. \* Estatisticamente diferente dos controles ( $P < 0,05$ ).

Com o objetivo de estudar o possível papel da  $\text{Na}^+$ -ATPase na proliferação do *Trypanosoma cruzi*, formas epimastigotas foram cultivadas com concentrações crescentes de furosemida (0,5, 2,0 e 5 mM) (Figura 8). Pode-se observar que a furosemida inibe a proliferação das formas epimastigotas de maneira dose-dependente. A adição de 2 mM de furosemida promoveu uma inibição do crescimento do parasito de 25% já no primeiro dia de cultura sendo essa inibição aumentada para mais de 80% após 5 dias. Estes resultados indicam que a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase desempenha um papel importante no crescimento do parasito e pode ser uma alvo para drogas tripanocidas como a miltefosina.

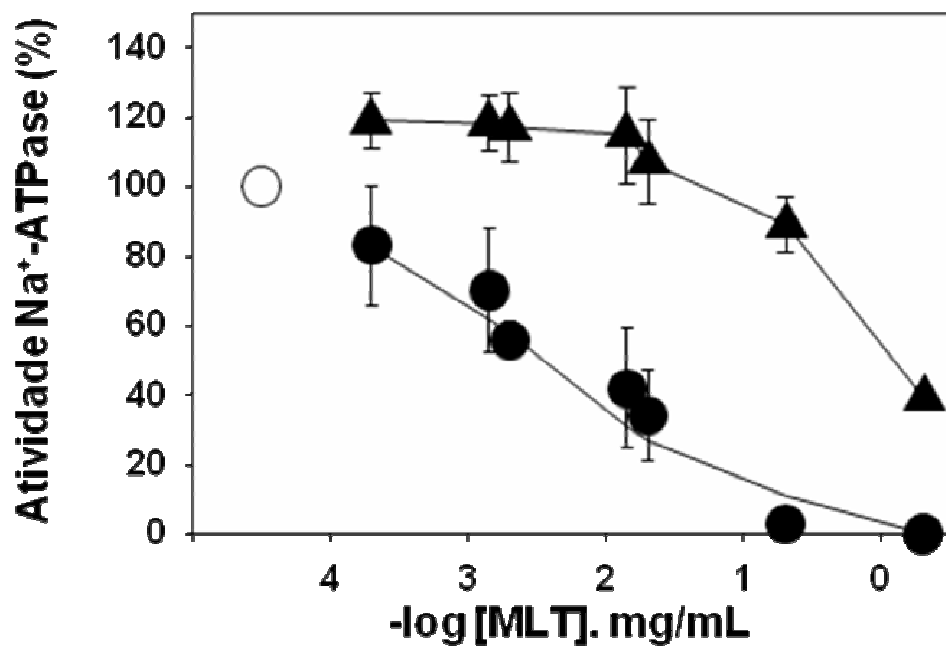


**Figura 8.** Importância da  $\text{Na}^+$ -ATPase para o crescimento do *T. cruzi*. Epimastigotas foram cultivados na ausência (controle) ou presença de concentrações crescentes de furosemida (0,5, 2,0 e 5 mM). O número de parasitos viáveis em cada cultura foi determinado por contagem direta durante 5 dias, cada ponto experimental corresponde à média  $\pm$  desvio padrão para triplicatas de três experimentos independentes.

#### 4.1.2 Modulação da Na<sup>+</sup>-ATPase pela miltefosina

No próximo grupo experimental, que teve como objetivo estudar o efeito da miltefosina sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase, foi observado que o aumento na concentração da miltefosina de 0,0003 a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> causou uma inibição da atividade enzimática de forma dose-dependente, com o efeito máximo observado em 0,03 mg mL<sup>-1</sup> no caso da Na<sup>+</sup>-ATPase da FM de epimastigotas (Figura 9). A concentração da miltefosina que promoveu a inibição em 50% da atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase do parasita (IC50), calculada através dos dados experimentais com a equação  $v = V_{\max}[S]/K_{0.5} + [S]$ , foi de  $0,018 \pm 0,005$  mg mL<sup>-1</sup>. De maneira comparativa, foram realizados experimentos para investigar se a miltefosina também era capaz de modular a Na<sup>+</sup>-ATPase insensível a ouabaína de células de mamíferos. Para testar a modulação da atividade enzimática de células de mamíferos foi utilizada uma membrana basolateral isolada (MBL) de células de tubulo proximal renal de porco, local onde a Na<sup>+</sup>-ATPase insensível a ouabaína é melhor caracterizada (Caruso-Neves *et al.*, 2002). Ao contrário do observado para a Na<sup>+</sup>-ATPase do *T. cruzi* em que concentrações relativamente baixas de miltefosina (0.0003-0.03 mg mL<sup>-1</sup>) já promoveu pronunciada inibição, uma inibição dose-dependente da Na<sup>+</sup>-ATPase da MBL só começa a ser observada a partir de concentrações  $\geq 0.03$  mg mL<sup>-1</sup> de miltefosina, condição em que a atividade enzimática em *T. cruzi* esta completamente inibida (Figura 9).

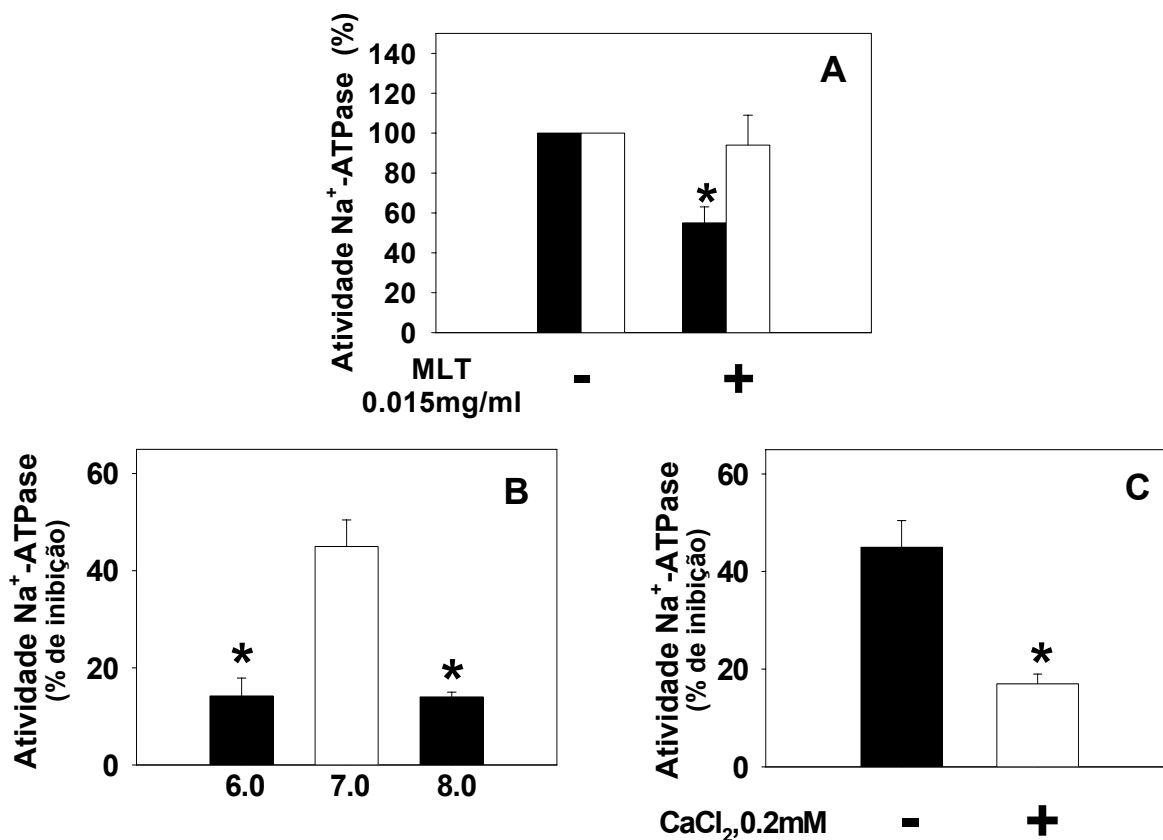
Como previamente demonstrado, um aumento na concentração de Na<sup>+</sup> de 2 a 120 mM aumentou a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase de forma dose-dependente. A concentração de Na<sup>+</sup> que promoveu 50% da estimulação máxima (K<sub>0.5</sub>) da atividade ATPase foi  $13,7 \pm 1,7$  mM e a velocidade máxima (V<sub>max</sub>) foi  $17,4 \pm 0,6$  nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. A adição de miltefosina aumentou a K<sub>0.5</sub> para  $28,5 \pm 5,3$  mM e diminuiu a V<sub>max</sub> para  $7,6 \pm 0,5$  nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Saraiva, 2004)



**Figura 9.** Efeitos da miltefosina sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase. Atividade Na<sup>+</sup>-ATPase na fração de membrana basolateral de células de tubulo proximal renal ( $13,7 \pm 3,01$  nmol Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) (triângulos) e da fração enriquecida de membrana de formas epimastigotas do *T. cruzi* ( $12,5 \pm 0,53$  nmol Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) (círculos), na ausência (símbolo aberto) ou presença (símbolos fechados) de quantidades crescentes de miltefosina (MLT). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes.

Foi demonstrado que o efeito inibitório da miltefosina sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase é completamente revertido, quando o meio reacional é diluído, e a concentração da droga é mantida a 0,015 mg ml<sup>-1</sup>. Esse resultado sugeriu que a droga está fracamente associada a enzima e que seu efeito inibitório é totalmente reversível (Saraiva 2004). Após essa verificação fomos observados os efeitos de baixa concentração de detergente na atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase de *T. cruzi* e na inibição causada pela miltefosina. Para isso, a FM foi pré-incubada na ausência ou presença de 0,1% de deoxicolato de sódio (DOC) durante 30 minutos e a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase foi medida na presença ou na ausência de 0,015 mg ml<sup>-1</sup> de miltefosina (Figura 10A). Quando a atividade Na<sup>+</sup>-ATPase foi medida utilizando-se FM pré-incubadas com 0,1% DOC, o efeito inibitório de 0,015 mg<sup>-1</sup> mL de miltefosina não foi observado. Além disso, observou-se que 0,1% DOC não alterou a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase da FM, o que sugere que provavelmente não houve a formação de micelas já que a concentração micelar crítica do DOC é de 3.1mM (Kato *et al.*, 1997) e a que foi utilizada nos ensaios foi de aproximadamente 2.3 mM (0.1% de DOC). Como observado anteriormente, a Na<sup>+</sup>-ATPase de *T. cruzi* apresenta um pH ótimo de 7 e tem essa atividade pouco afetada quando o pH é diminuído até 6 (Figura 7A), o contrário do observado quando o pH é ajustado para uma condição mais alcalina. Com o intuito de compara a ação da miltefosina sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase nessas diferentes condições de pH, a enzima foi ensaiada nos pHs 6, 7 e 8 na presença de quantidade da droga capaz de inibir aproximadamente 50% da atividade da enzima em pH 7 e os resultados foram apresentados na Figura 10B. Pode-se observar que tanto em pH ácido (6) quanto em pH alcalino (8) houve uma drástica queda na capacidade inibitória da miltefosina sobre a atividade da enzima. De maneira semelhante, essa capacidade de inibição foi também significativamente reduzida quando 0,2 mM de CaCl<sub>2</sub> (correspondendo a 130 mM de Ca<sup>++</sup> livre) era incluído na reação (Figura 10C)



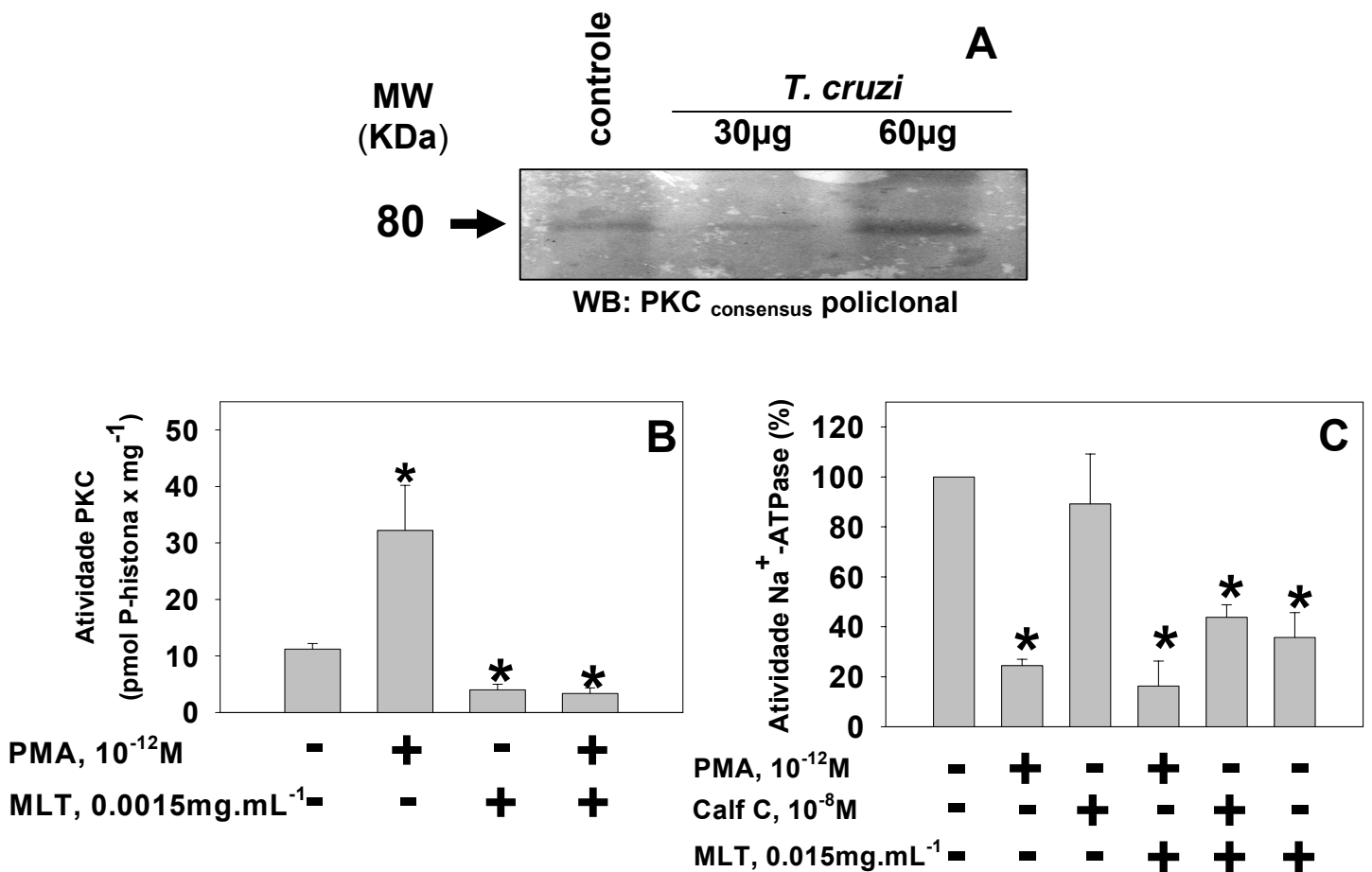


**Figura 10** Atividade Na<sup>+</sup>-ATPase de epimastigotas dependente de detergente, pH e Ca<sup>++</sup>. Atividade Na<sup>+</sup>-ATPase 12,5 ± 0,53 nmol Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. (A) As frações de membrana foram pré-incubados na ausência (barra fechada) ou presença (barra aberta) de 0,1% (w / v) de deoxicolato de sódio durante 30 minutos a 28°C antes da medição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase na ausência (-) ou na presença (+) de 0,015 mg ml<sup>-1</sup> de miltefosina (MLT) . (B) A percentagem de inibição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase de epimastigotes por 0,015 mg mL<sup>-1</sup> de miltefosina foi comparada em pH 6, 7 e 8. (C) Os efeitos da miltefosina sobre a inibição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase foi estimada em pH 7 como em (B), mas na ausência (-) ou presença (+) de Ca<sup>++</sup>. Os valores são a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. \* Estatisticamente diferente dos controles, na ausência de DOC (A), pH 7 (B) Ca<sup>++</sup> (C) (*P* <0,05).

#### **4.1.3 Verificação da atividade da PKC e sua possível modulação pela miltefosina e interferência na atividade Na<sup>+</sup>-ATPase**

Conforme discutido anteriormente, a PKC parece desempenhar um papel crucial no crescimento do parasita (Einicker-Lamas et al., 2000). Em células de mamíferos esta enzima é estimulada por 12-meristato 13-acetato forbol éster (PMA) e inibida por calfostina C e é responsável pela modulação da Na<sup>+</sup>-ATPase (Rangel et al., 2001). No *T. cruzi* os mecanismos envolvidos na modulação da PKC e sua participação nos processos de sinalização ainda precisam ser mais estudados (Malaquias e Oliveira 1999). A presença da PKC na FM do *T. cruzi* foi detectada por immunoblotting utilizando um anticorpo policlonal PKC consenso (Figura 11A). O immunoblotting para PKC revelou uma banda de cerca de 80 kDa, o que corresponde ao peso molecular desejado para a PKC majoritária do *T. cruzi* (Gómez et al., 1999). A MBL de células de tubulo proximal renal foi utilizada como controle positivo para a ligação do anticorpo. A atividade da PKC foi medida através da utilização de histona como substrato, e foi observada uma atividade PKC basal (sensível a calfostina C) correspondente a  $11,2 \pm 1,1$  pmol P-histonas  $\text{mg}^{-1}$  que foi estimulada cerca de 3 vezes pelo PMA, ( $32,2 \pm 8,0$  pmol P-histonas  $\text{mg}^{-1}$ ). Estes resultados demonstraram que existe uma atividade constitutiva e funcional de PKC na fração enriquecida de membrana plasmática de *T. cruzi* que é estimulada por PMA. A inclusão de apenas  $0.0015 \text{ mg mL}^{-1}$  de miltefosina foi capaz de inibir em torno de 70% a atividade basal da PKC, efeito que não foi revertido na presença de PMA (Figura 11B).

Apesar da demonstração da expressão da Na<sup>+</sup>-ATPase localizada na membrana plasmática e o seu possível papel no *T. cruzi*, pouco se sabe sobre a sua modulação (Iizumi et al., 2006). A Figura 11C mostra que o PMA, um ativador da PKC (Figura 11B), inibiu em 70% a atividade enzimática Na<sup>+</sup>-ATPase e este efeito foi totalmente abolido pela calfostina C, um inibidor específico dessa enzima. Além disso, observou-se que o efeito inibitório do PMA e da miltefosina em conjunto foi semelhante e não-aditivo ao efeito observado só com o PMA, e o efeito inibitório da miltefosina não foi revertido pela calfostina C.



**Figura 11.** Detecção da PKC nas frações enriquecidas de membrana de epimastigotas e modulação das atividades PKC e Na<sup>+</sup>-ATPase pela miltefosina (MLT). (A) Detecção por imunoblotting da PKC de membrana basolateral (MBL) de túbulos proximais (controle 30 µg) e frações enriquecidas de membrana de formas epimastigotas de *T. cruzi*. (B) Atividade basal da PKC de membranas de *T. cruzi* medida na ausência (-) ou presença (+) de forbol ester (PMA) e / ou miltefosina (MLT). (C) Papel da PKC na ativação da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase foi estimada por medições na ausência (-) ou presença (+) do PMA, Calfofostina C (Calf C), e / ou MLT. Os valores são a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes. \* Estatisticamente diferente do controle ( $P < 0,05$ )

#### **4.2 Efeitos da miltefosina no tratamento de camundongos BALB/c em fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* cepa Y.**

Estudos anteriores Croft e colaboradores (1996) e Saraiva e colaboradores (2002) demonstraram resultados comparativos sobre a eficácia da administração oral da miltefosina em camundongos BALB/c infectados com o *T. cruzi* na fase aguda da doença. Enquanto o primeiro grupo argumentou que a droga não era eficaz no tratamento, o segundo grupo demonstrou que a miltefosina apresentava efeitos muito semelhantes à droga de escolha para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol, com uma eficaz redução da parasitemia e mortalidade dos camundongos tratados. Análises preliminares também demonstraram essa eficácia em modelo experimental agudo utilizando camundongos não isogênicos Swiss (Saraiva, 2004), onde foi demonstrado que nesse modelo miltefosina promovia, além da redução da parasitemia e mortalidade dos animais, uma drástica redução da inflamação do coração e fígado, e ausência de ninhos de amastigotas no coração.

Apesar dos seus efeitos tripanocidas e de não ser tóxico para macrófagos em cultura, foi observado que o benzonidazol ao contrário da miltefosina (Saraiva *et al.*, 2002), causa uma inibição na produção de nitrito e TNF- $\alpha$  além de outras citocinas pró e antiinflamatórias como IL-6, IL10 e a produção de IL-1 $\beta$  induzida por LPS (Revelli *et al.*, 1999). Entretanto vários estudos utilizando diferentes modelos experimentais murino e mesmo em pacientes tem mostrado que o benzonidazol sinergiza com a resposta imune do hospedeiro induzindo maior resistência à infecção pelo parasito (Michailowsky *et al.*, 1998; Murta *et al.*, 1999; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Romanha *et al.*, 2002;) e reduzindo o dano produzido no tecido cardíaco (Garcia *et al.*, 2005).

Visto que tanto o benzonidazol quanto a miltefosina apresentam uma eficácia comparável no tratamento experimental de um modelo agudo da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos, mas o benzonidazol, ao contrário da miltefosina pode alterar o balanço entre os mediadores pró e antiinflamatórios com importantes conseqüências para o curso da infecção, uma série de experimentos

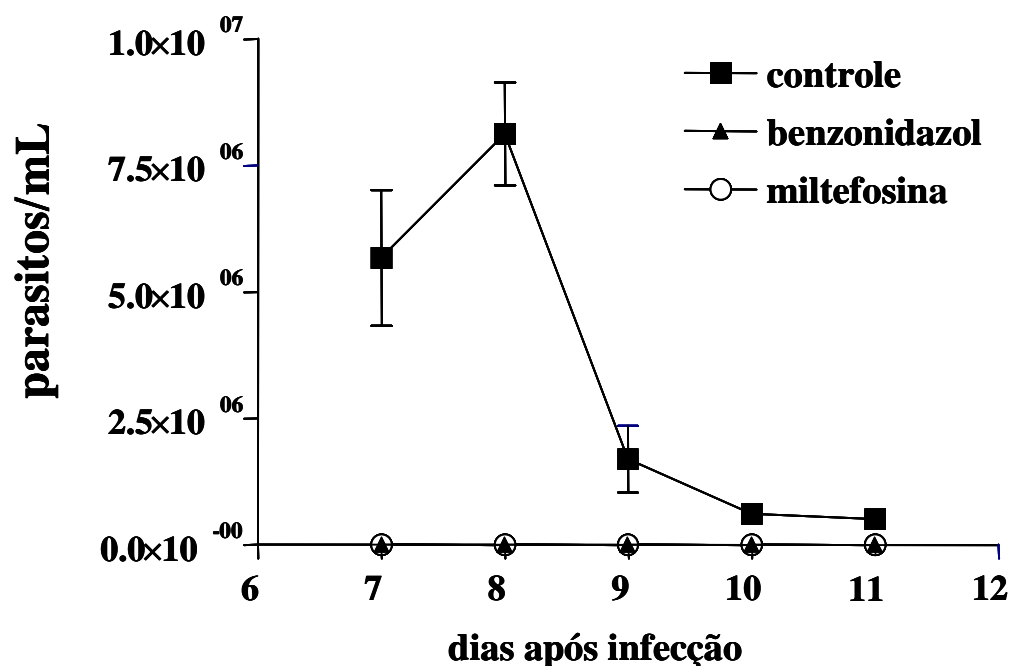
foram realizados comparando os efeitos do tratamento de camundongos BALB/c na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

O objetivo principal nesse capítulo foi avaliar a eficácia da miltefosina em comparação ao benzonidazol com relação a: parasitemia, dano cardíaco através da dosagem plasmática da CK-MB, histopatologia, imunohistoquímica e citometria de fluxo de células isoladas do coração, com o intuito de caracterizar os principais tipos celulares do infiltrado inflamatório, causado pela infecção, e analisar possíveis efeitos imunomodulatórios.

#### **4.2.1 Efeitos da miltefosina e do benzonidazol na parasitemia de camundongos BALB/c infectados com a cepa Y do *T. cruzi*.**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais sendo um grupo mantido sem infecção e outros três grupos infectados com  $10^3$  tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (mantidos como descrito no item 3.2.1.2 dos materiais e métodos) da cepa Y por via intraperitoneal. Destes três grupos de animais infectados, um grupo foi tratado com solução salina enquanto os outros dois grupos foram tratados oralmente com  $25\text{mg. mL}^{-1}$  de miltefosina ou  $100\text{mg. mL}^{-1}$  de benzonidazol diariamente durante 15 dias sendo o tratamento iniciado 3 h após a infecção.

Como pode ser observado na Figura 12, tanto o benzonidazol quanto a miltefosina reduziram significativamente a parasitemia durante o estabelecimento da fase aguda da infecção.



**Figura 12.** Parasitemia de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*. Camundongos BALB/c foram infectados intraperitonealmente com  $10^3$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y. e separados em 3 grupos de 8 camundongos cada, onde um grupo não foi tratado (■) e os outros dois foram tratados por via oral 3 h após a infecção durante 15 dias com  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de benzonidazol (▲) ou  $25 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de miltefosina (○). Como indicado na figura, o número de parasitos no sangue foi determinado por contagens diretas nos dias 7, 8, 9 10 e 11 após a infecção. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com 8 camundongos cada grupo experimental.

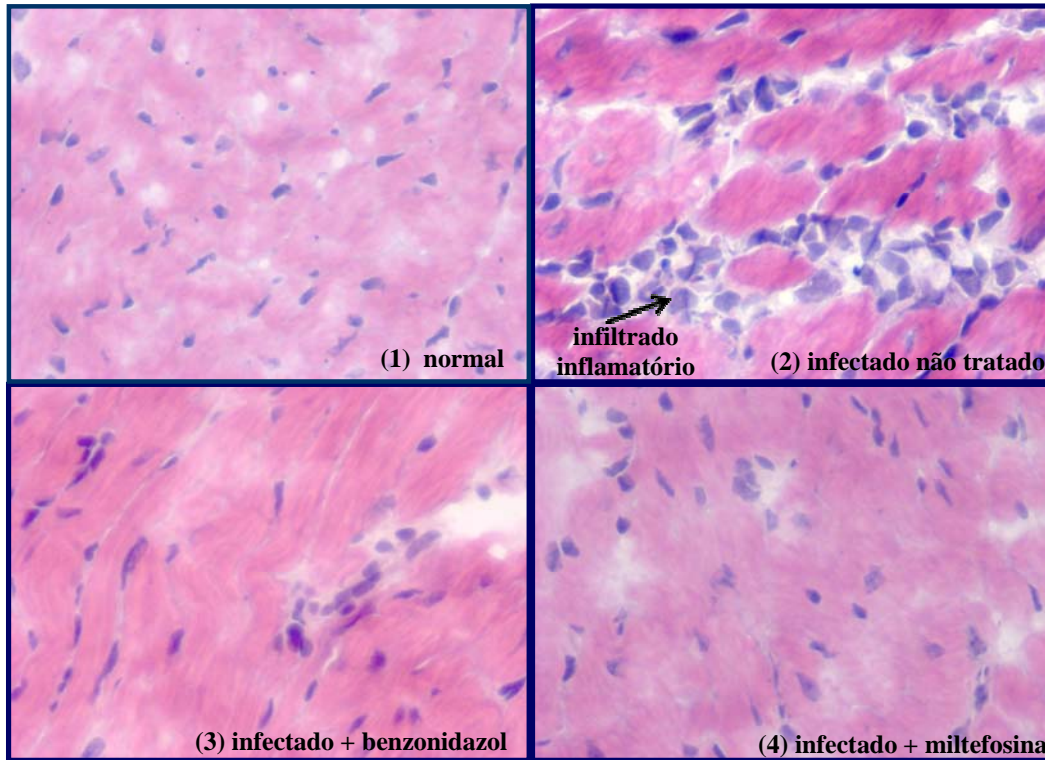
#### ***4.2.2 Avaliação histopatológica do tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados com T. cruzi cepa Y e tratados com benzonidazol ou miltefosina.***

Com o objetivo de avaliar o efeito da miltefosina contra os processos patológicos de fase aguda, a área de infiltrado inflamatório e o número de ninhos de amastigotas do tecido cardíaco foram quantificados comparando animais tratados e não tratados. Os camundongos BALB/c não tratados e tratados com benzonidazol e ou miltefosina, foram sacrificados e o coração foi congelado, cortado em criostato em cortes de 4µm que foram montados em lâminas e corados com por HE. Os animais sem infecção, como esperado, não apresentaram células inflamatórias no tecido cardíaco ou qualquer alteração aparente na organização do tecido (Figura 13A<sub>1</sub>). O coração dos animais infectados não tratados apresentou infiltrados inflamatórios difusos como indicado pela seta na Figura 13 A<sub>2</sub>. O número de células em infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco dos animais tratados com benzonidazol (Figura 13A<sub>3</sub>) ou miltefosina (Figura 13A<sub>4</sub>) foi significativamente menor que os observados nos camundongos infectados e não tratados (Figura 13A<sub>2</sub>). Esses dados foram confirmados através de análise estatística comparativa entre os animais infectados não tratados e os tratados com benzonidazol ou miltefosina (Figura 13B). A avaliação do número de ninhos de amastigotas dos corações dos animais tratados e não tratados foi feita em proporção de ninhos/campo (Figura 14A). Após a análise dos resultados, foi observada a presença de aproximadamente 0.13 ninhos/campo nos animais infectados e não tratados (indicado pela seta na figura 14A) e a ausência de ninhos tanto nos animais tratados com miltefosina quanto nos tratados com benzonidazol (Figura 14B).

**Figura 13.** *Infiltração inflamatória cardíaca e número de ninhos de amastigotas.* Camundongos BALB/c de grupos normais, infectados e não tratados e tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina foram sacrificados e tiveram o coração extraído e seccionado para análise histológica (HE). (A) Microscopia óptica (Objetiva de 40x) e (B) quantificação de células de infiltrados inflamatórios por campo no tecido cardíaco de camundongos BALB/c após 15 dias de infecção pelo *T. cruzi* cepa Y. Benzonidazol (BZ), miltefosina (MLT). Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com 8 camundongos cada grupo experimental. \* Estatisticamente diferente dos grupos infectados não tratados ( $P < 0,05$ )



**A**



**B**

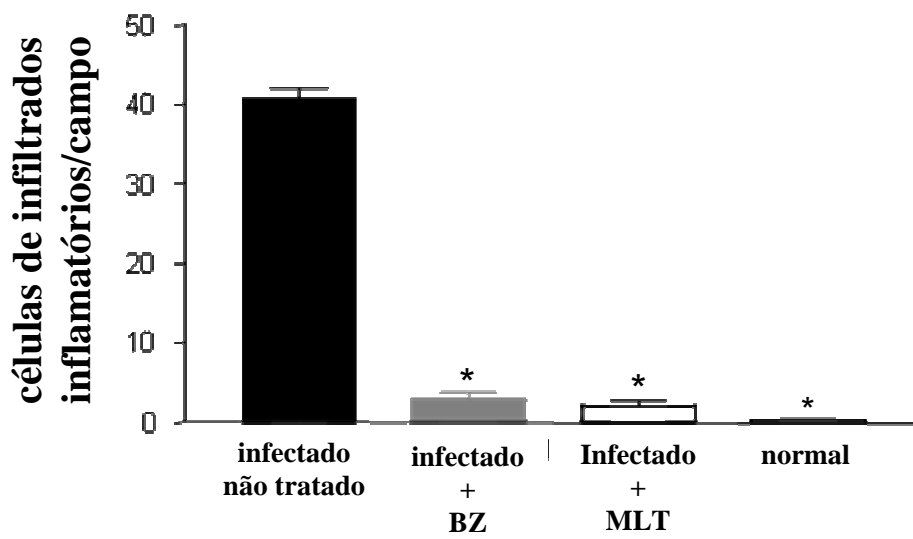
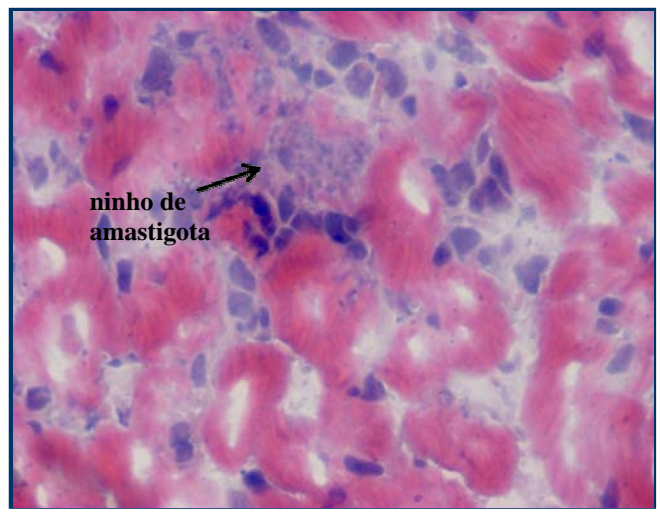


Figura 13

**Figura 14.** *Número de ninhos de amastigotas.* Camundongos BALB/c de grupos normais, infectados e não tratados e tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina foram sacrificados e tiveram o coração extraído e seccionado para análise histológica (HE). (A) Microscopia óptica (Objetiva de 40x) e (B) quantificação dos ninhos de amastigotas encontrados no tecido cardíaco dos animais infectados após 15 dias. Benzonidazol (BZ), miltefosina (MLT). Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com 8 camundongos cada grupo experimental. \* Estatisticamente diferente dos grupos infectados não tratados ( $P < 0,05$ ).

**A**



**B**

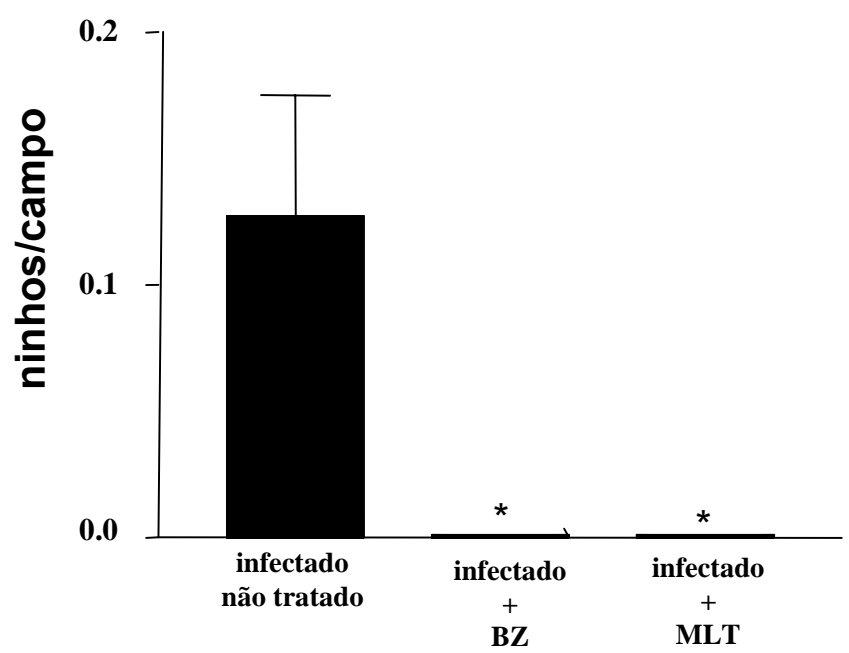


Figura 14

#### **4.2.3 Verificação da presença de antígenos de amastigotas no tecido cardíaco**

A presença do parasito é fundamental no processo de injúria tecidual durante o curso da infecção aguda da doença de Chagas (Dos Reis *et al.*, 2005). A comparação de biópsias endomiocárdicas entre pacientes em fase aguda ou fase crônica da doença de Chagas, demonstrou que em fase aguda 100% desses pacientes apresentam miocardite e 58% antígenos do *T. cruzi*, enquanto que em pacientes na fase crônica esses valores foram reduzidos para 45% de miocardite e 0% de antígenos do *T. cruzi* (Higuchi *et al.*, 2003). Com a finalidade de verificar com maior precisão a presença do parasito no coração dos animais tratados ou não com benzonidazol e miltefosina, realizaram a imunohistoquímica do tecido cardíaco desses animais para a detecção de antígeno do parasita utilizando um anticorpo contra antígenos de amastigotas (Figura 15). Na figura 15A<sub>1</sub> foi observado o tecido cardíaco dos animais normais e na Figura 15A<sub>2</sub>, indicado pela seta, a marcação do antígeno das formas amastigotas. Os resultados mostram a diminuição significativa da marcação de antígeno de amastigota no tecido cardíaco dos animais tratados com benzonidazol (Figura 15 A<sub>3</sub>) ou miltefosina (15A<sub>4</sub>). Esses dados foram quantificados e demonstrados respectivamente na Figura 15B.

**Figura 15.** *Quantificação da % de antígenos do T.cruzi do tecido cardíaco.* Camundongos BALB/c de grupos normais, infectados e não tratados e tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina foram sacrificados e tiveram o coração extraído e seccionado para análise imunohistoquímica. (A) Microscopia óptica, detecção do antígeno de amastigotas (Objetiva de 40x), realizada através de imunohistoquímica como descrito nos materiais e métodos (item 3.3.6.1), (B) quantificação da porcentagem de antígenos de amastigotas. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com 8 camundongos cada grupo experimental. \* Estatisticamente diferente dos controles ( $P < 0,05$ ).

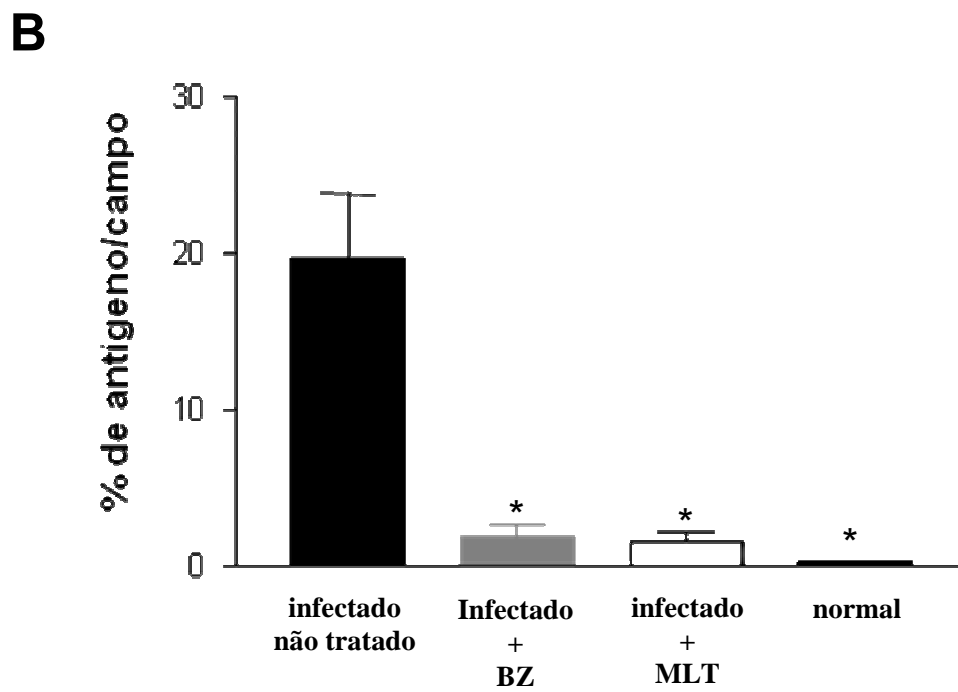
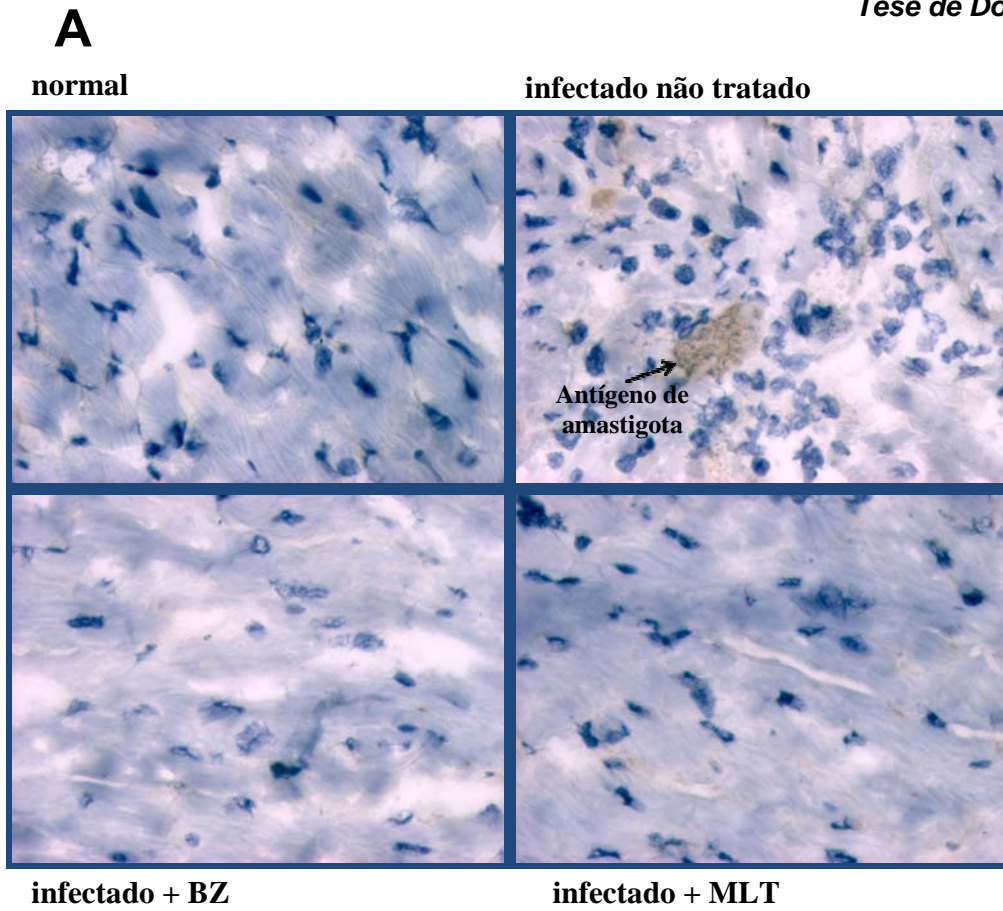


Figura 15

#### **4.2.4 Quantificação das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> do infiltrado inflamatório cardíaco**

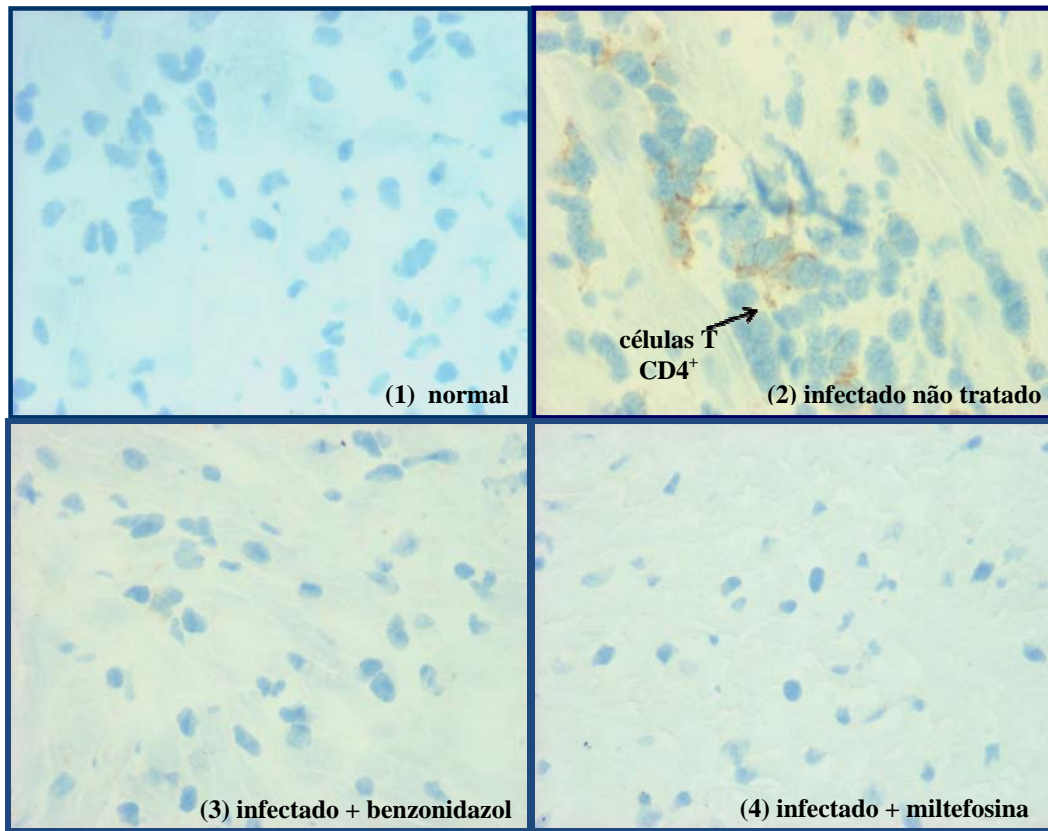
Na doença de Chagas a injúria tecidual está relacionada à presença do parasita e conseqüentemente ao processo inflamatório por ele desencadeado (Higushi *et al.*, 2003). O infiltrado inflamatório possui na sua formação células mononucleares e principalmente linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, pois a ativação e diferenciação dessas células inflamatórias são necessárias para o controle da infecção pelo *T. cruzi* (Dos Reis, *et al.*, 2005).

Durante a infecção pelo *T. cruzi* foi demonstrado que há um aumento do número de células TCD4<sup>+</sup>, em paralelo com o aumento do número de células TCD8<sup>+</sup> na fase aguda, mas não na fase crônica (Higushi *et al.*, 2003). Na fase crônica, pacientes com insuficiência cardíaca apresentam um predomínio das células TCD8<sup>+</sup>. Com o objetivo de verificar a presença de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> infiltrantes no coração dos camundongos BALB/c infectados, e não tratados ou infectados e tratados com benzonidazol ou miltefosina, estes foram seccionados e incubados com anticorpos anti-CD4<sup>+</sup> ou anti-CD8<sup>+</sup>, sendo os resultados apresentados nas Figuras 16 e 17. Nesses ensaios experimentais observamos uma diminuição significativa tanto de células TCD4<sup>+</sup> (Figura 16A) quanto de células TCD8<sup>+</sup> (Figura 17A) nos animais tratados com benzonidazol (Figura 16A<sub>3</sub> e 17A<sub>3</sub>) ou tratados com miltefosina (Figura 16A<sub>4</sub> e 17A<sub>4</sub>) em comparação aos animais infectados e sem tratamento (Figura 16A<sub>2</sub> e 17A<sub>2</sub>). A quantificação das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos diferentes grupos experimentais está representada respectivamente nas Figuras 16B e 17B.

**Figura 16.** Avaliação de células TCD4<sup>+</sup> do infiltrado inflamatório cardíaco de camundongos BALB/c. Foram usados grupos de camundongos normais, infectados não tratados e infectados e tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina durante 15 dias e posteriormente sacrificados para a coleta do coração. (A) Microscopia óptica, detecção de células TCD4<sup>+</sup> (Objetiva de 40x), realizada através de imunohistoquímica como descrito nos materiais e métodos (item 3.3.6.1) e (B) quantificação das células TCD4<sup>+</sup>. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos independentes com 8 camundongos cada grupo experimental.\* Estatisticamente diferente dos controles ( $P < 0,05$ ).



**A**



**B**

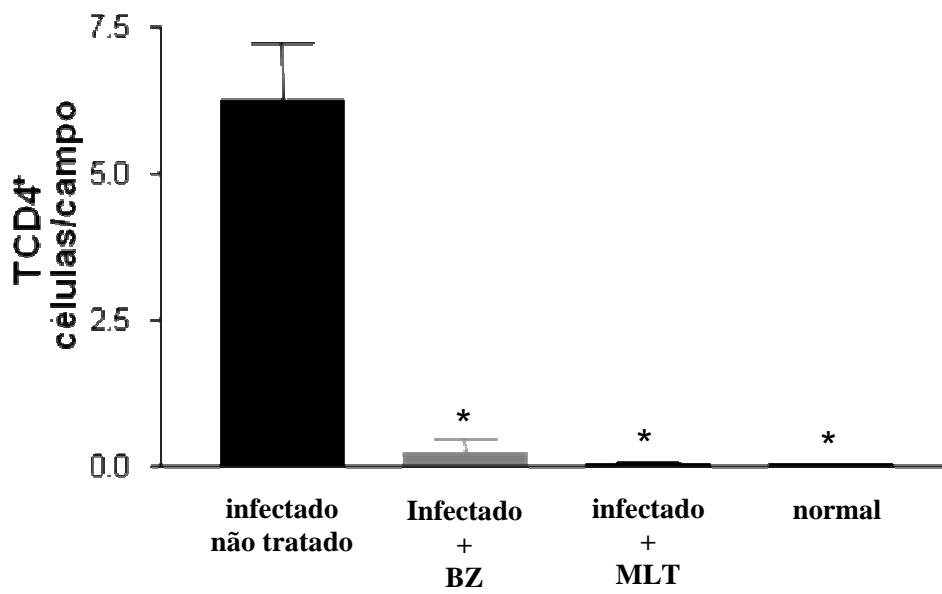
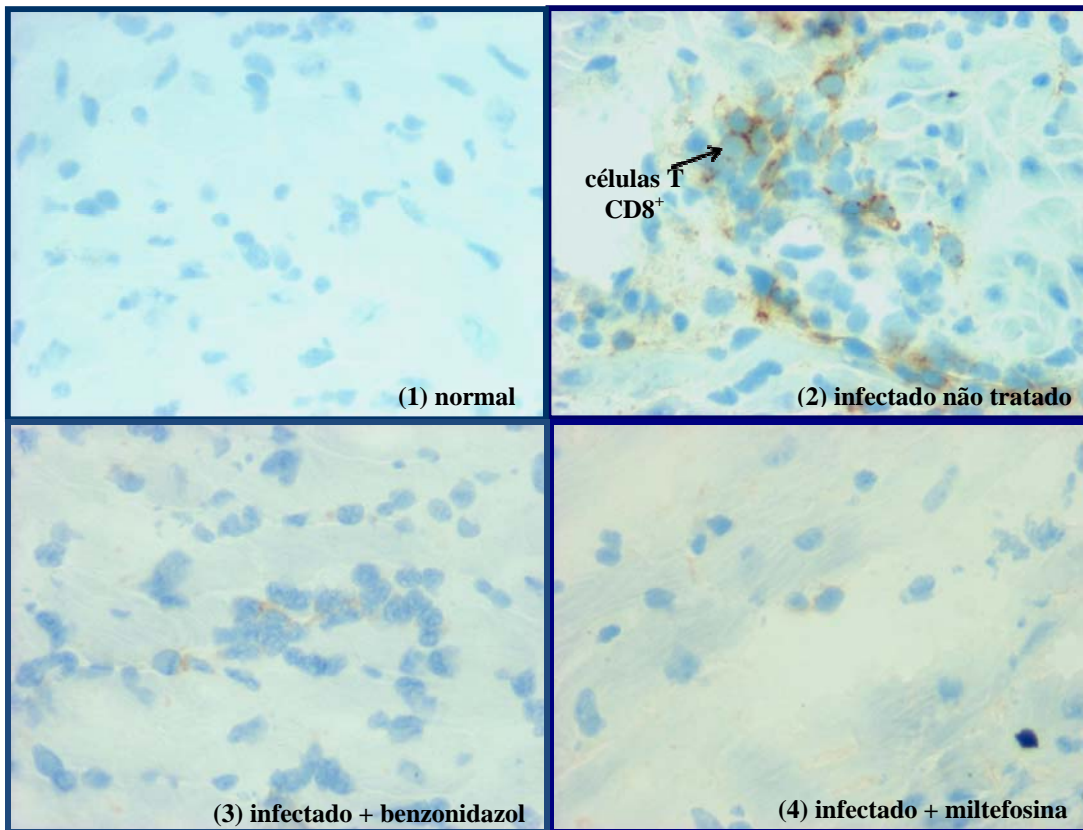


Figura 16

**Figura 17.** Avaliação de células TCD8<sup>+</sup> do infiltrado inflamatório cardíaco de camundongos BALB/c. Foram usados grupos de camundongos normais, infectados não tratados e infectados e tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina durante 15 dias e posteriormente sacrificados para a coleta do coração. (A) Microscopia óptica, detecção de células TCD4<sup>+</sup> (Objetiva de 40x), realizada através de imunohistoquímica como descrito nos materiais e métodos (item 3.3.6.1) e (B) quantificação das células TCD8<sup>+</sup>. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos independentes com 8 camundongos cada grupo experimental.\* Estatisticamente diferente dos controles ( $P < 0,05$ ).

**A**



**B**

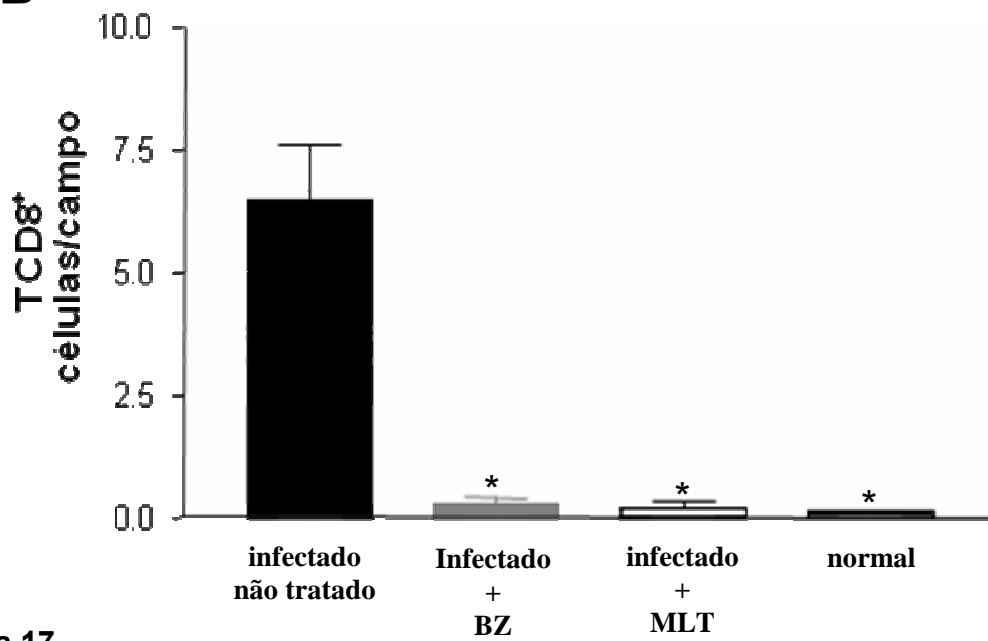


Figura 17

#### **4.2.5 Análise parcial do fenótipo de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> do baço e do infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de camundondos BALB/c infectados e tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina**

A infecção experimental com o *T. cruzi*, induz profundas alterações em populações de células imunes e órgãos linfóides (Leite de Moraes *et al.*, 1992). Essas alterações incluem esplenomegalia, atrofia timica, e ativação policlonal de ambas as células T e células B associadas com hipergamaglobulinemia (Minóprio *et al.* 1986). Infiltrados celulares inflamatórios foram observados em muitos tecidos, incluindo o coração (Santos *et al.*, 2001), esôfago e cólon (Sun e Tarleton, 1993) em modelo humano e murino (Henriques-Pons *et al.*2005).

O recrutamento e a migração de células imunitárias em direção aos sítios inflamatórios dos tecidos alvo é um processo que depende da natureza e do estado de ativação das células inflamatórias e é coordenado por receptores que reconhecem um mosaico de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e componentes da matriz extracelular (Santos *et al.*, 2001). Em doenças infecciosas, a instauração de processos inflamatórios é crucial para a eliminação do agente infeccioso e para a resolução da infecção nos tecidos alvo.

Com o objetivo de verificar uma possível alteração dos fenótipos das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> pela ação do benzonidazol e da miltefosina durante o curso do processo inflamatório, migração e ativação das células T, provocado pela presença do *T. cruzi* no tecido cardíaco, foi feita uma análise da expressão de moléculas envolvidas no processo migratório e de ativação das células T (respectivamente CD62L, LFA-1 e CD2) do coração e baço de camundongos BALB/c infectados com o *T.cruzi* tratados ou não com benzonidazol ou miltefosina.

Foram observados percentuais altos de células CD4 e CD8 expressando a selectina CD62L no baço, tanto no grupo não tratado como nos grupos tratados (70-100% de células T CD62L+) (Figura 18A). No coração entretanto, houve uma modulação negativa da molécula e encontramos menos de 10% das células T expressando CD62L no grupo não tratado (Figura 18B), assim como observado por outros autores (Lannes-Vieira 2003; Martin e Tarleton 2005). Já nos grupos tratados houve um aumento no percentual de células CD62L+, chegando a até

50% das células T. É importante ressaltar, entretanto, que a frequência da molécula por célula continuava baixa, ou seja, há mais células expressando o marcador, mas o número de moléculas por célula era equivalente ao grupo não tratado (dado não mostrado).

Com relação a integrina LFA-1 nas células T de baço, foram observados de 60 a 100% de células positivas (Figura 18C), assim como altos níveis de células T cardíacas expressando a molécula no grupo infectado não tratado (Figura 18D). Contudo, houve uma modulação negativa na expressão da molécula em células TCD8<sup>+</sup> no grupo tratado com benzonidazol e ambas subpopulações de célula T modularam negativamente a expressão da molécula no grupo tratado com miltefosina (Figura 18D).

O co-receptor CD2 também é uma molécula importante para a função de células T e foram observados grandes modulações na sua expressão nas células de baço, variando de 70 a 100% das células CD2<sup>+</sup> (Figura 18E) De forma interessante, houve uma grande redução no percentual de células T cardíacas expressando CD2<sup>+</sup>, com menos de 20% no coração dos animais tratados com miltefosina (Figura 18F). No seu conjunto os resultados sugerem que além dos efeitos tóxicos diretos sobre o parasita estas drogas induzem efeitos imunomodulatórios que podem ajudar a reduzir os danos inflamatórios causados durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

**Figura 18.** *Fenótipo parcial de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> do infiltrado inflamatório do tecido cardíaco e do tecido esplênico de camundongos BALB/c. Após 15 dias de infecção os animais foram sacrificados e tiveram coração e baço coletados para a análise por citometria de fluxo, como descrito nos materiais e métodos (item 3.3.7). Foi avaliado o percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando as moléculas CD62L, LFA-1 e CD2 do baço (respectivamente A, C, E) e do coração (respectivamente B, D, F) dos animais infectados não tratados (infectados) e infectados tratados com benzonidazol (BZ) e miltefosina (MLT). Resultados representativos de dois experimentos independentes onde foram utilizados 8 camundongos para cada grupo experimental.*

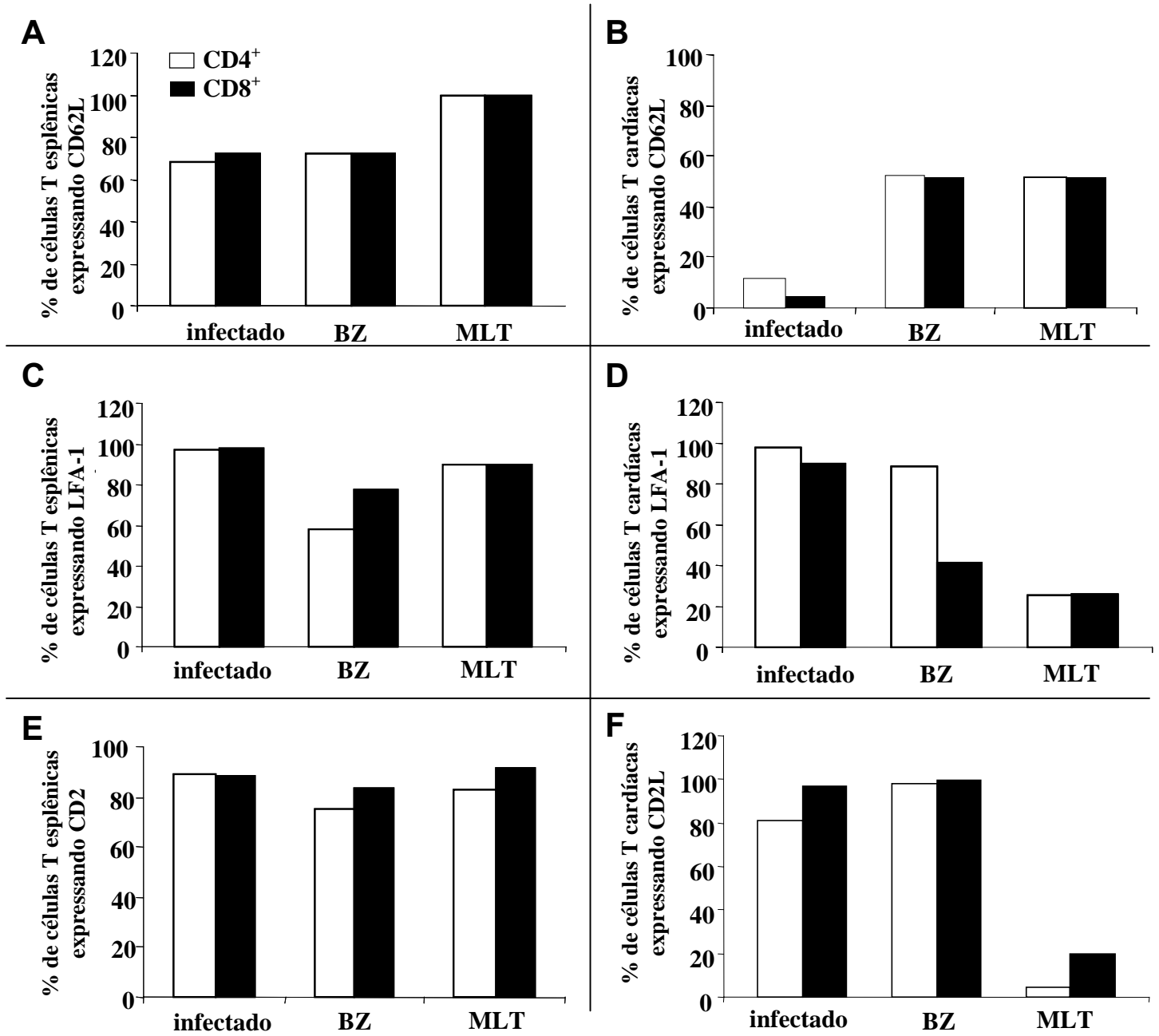
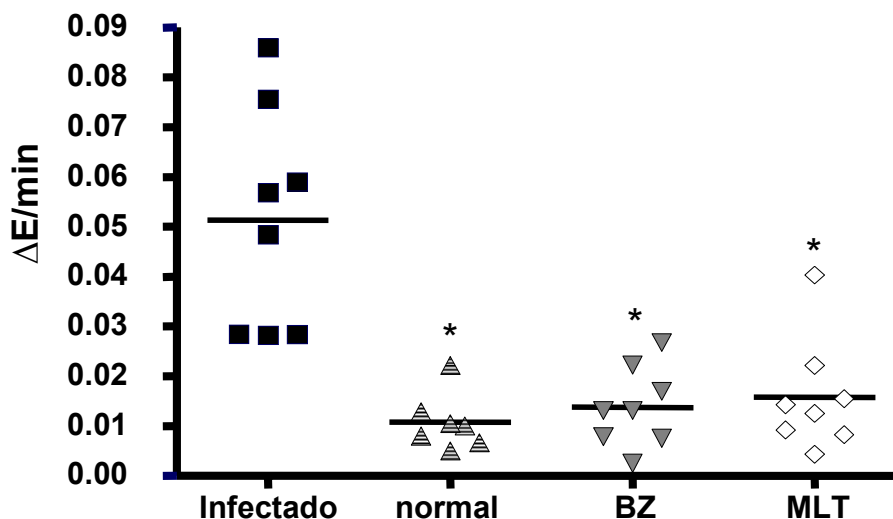


Figura 18

#### 4.2.6 Avaliação da atividade da enzima Creatina Quinase, isotipo cardíaco (CK-MB), do plasma de camundongos BALB/c infectados com o T. cruzi

O grau do dano tecidual causado durante a infecção também foi mensurado através da análise da atividade da enzima CK-MB em animais normais, infectados não tratados e infectados e tratados com benzonidazol ou miltefosiana. Verificamos que ao contrário dos animais infectados e não tratados os animais tratados com ambas as drogas apresentaram atividade CK semelhante à observada nos animais normais (Figura 19) indicando a manutenção da integridade do tecido cardíaco.



**Figura 19.** Verificação da atividade da enzima CK-MB em camundongos normais e infectados não tratados ou tratados com benzonidazol ou miltefosina. O plasma sanguíneo dos animais dos diferentes grupos experimentais foi coletado no 15º dia após a infecção e utilizado para ensaios de atividade CK-MB. A atividade de CK-MB do plasma de cada animal de um experimento representativo foi apresentada na figura, sendo que as barras horizontais indicam o valor médio de atividade para cada grupo experimental de dois experimentos independentes onde foram utilizados 8 camundongos para cada grupo experimental. \* Estatisticamente diferente do controle infectado e não tratado ( $P < 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na homeostase de íons do *T. cruzi* são fundamentais para a sobrevivência desse parasita (Gil *et al.*, 2003), e podem ser um importante alvo para a ação de novos medicamentos a serem utilizados no tratamento da doença de Chagas. Na primeira parte deste trabalho foi demonstrado que: (i) a Na<sup>+</sup>-ATPase insensível a ouabaína e sensível à furosemida está preferencialmente associada à uma fração enriquecida de membrana de formas epimastigotas de *T. cruzi*, e tem sua atividade ótima em pH 7 que é levemente estimulada na presença de Ca<sup>++</sup>; (ii) esta Na<sup>+</sup>-ATPase parece desempenhar um papel importante no crescimento do parasita uma vez que a proliferação de formas epimastigotas foi inibida de maneira dose-dependente pela furosemida; (iii) a miltefosina inibe a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase e da PKC presentes na fração enriquecida de membrana de epimastigotas; (iv) ao contrário do observado em mamíferos, em *T. cruzi* a PKC não é capaz de estimular a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase e parece sim, ser capaz de inibi-la.

A Na<sup>+</sup>-ATPase insensível a ouabaína foi clonada e demonstrou ser codificada pelo gene *TcENA* e expressa apenas na membrana plasmática do parasito (Iizumi *et al.*, 2006). Esta enzima pertence à família das ATPases do tipo P e, conseqüentemente, exibe pelo menos dois grandes estados conformacionais, E1 e E2, assim como outros ATPases do tipo P (Moller *et al.*, 1996). Uma característica importante desta enzima em células de mamíferos (Provérbio *et al.*, 1986), *Entamoeba histolytica* (De Souza *et al.*, 2007a) e em *T. cruzi* (Caruso-Neves *et al.*, 1999, e Fig. 7C) é ser completamente inibida por furosemida. Esta droga é um conhecido inibidor do cotransportador de Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> / 2Cl<sup>-</sup> (O'Grady *et al.* 1987). Contudo, o efeito da furosemida observado em nossos estudos não pode ser associado à inibição desse cotransportador pois o mesmo não é capaz de hidrolisar ATP e não está expresso em *T. cruzi* (Gil *et al.*, 2003). O mecanismo de ação da furosemida sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase ainda não está totalmente elucidado, embora tem sido postulado que a furosemida liga-se a Na<sup>+</sup>-ATPase na forma E2. Um complexo inibitório (E2-furo) é formado, estabilizando a enzima no estado E2,

congelando o ciclo catalítico e prejudicando a fosforilação estimulada por ATP (De Souza *et al.*, 2007a).

A Na<sup>+</sup>-ATPase do *T. cruzi* apresenta algumas características semelhantes às que são observadas em células de mamíferos (Proverbio *et al.*, 1989), em relação ao pH ótimo e a dependência de Ca<sup>++</sup>. Todavia, esta enzima é estimulada pelo K<sup>+</sup> (Iizumi *et al.*, 2006), e insensível a K<sup>+</sup> em células de mamíferos (De Souza *et al.*, 2007b). Essas diferenças podem ser uma consequência adaptativa durante o curso do processo de evolução quando certos mecanismos celulares são mantidos, mostrando como eles são cruciais para a adaptação de uma grande variedade de organismos ao ambiente a que estão expostos. Desta forma, a observação de que a Na<sup>+</sup>-ATPase de protozoários é estimulada por Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>, poderia refletir uma adaptação para o ciclo de vida do parasito.

O papel da Na<sup>+</sup>-ATPase do *T. cruzi* ainda é uma questão aberta. Foi demonstrado que o aumento da expressão dessa enzima em formas epimastigotas aumenta a tolerância dos parasitas ao stress causado pela alta concentração de Na<sup>+</sup> do meio (Iizumi *et al.*, 2006). Essa enzima cria um gradiente de Na<sup>+</sup> transmembranar que pode ser utilizado para diferentes cotransportadores dependentes de Na<sup>+</sup>, para o transporte de íons orgânicos, solutos cruciais para o crescimento do parasito. Em estudos recentes, foi demonstrado que a inibição da Na<sup>+</sup>-ATPase por furosemida inibe a captação de *myo*-inositol, que é essencial para o crescimento do *T. cruzi* (Einicker-Lamas *et al.*, 2000). Aqui (Fig. 8), foi demonstrado que a inibição dose-dependente da Na<sup>+</sup>-ATPase por furosemida diminui o crescimento do *T. cruzi* e um resultado semelhante foi observado em *L. amazonensis* onde a inibição da Na<sup>+</sup>-ATPase também inibiu o crescimento desse parasito (de Almeida Amaral *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que ocorra uma supressão no gradiente de Na<sup>+</sup>, inibindo os cotransportadores dependentes desse íon.

Gómez e colaboradores (1999) demonstraram que a PKC é encontrada tanto no citosol quanto nas frações de membrana de formas epimastigotas do *T. cruzi*, onde tem sido demonstrada a sua ativação pelo forbol ester (PMA) na presença de Ca<sup>++</sup>. Este resultado está de acordo com a presença da isoforma  $\alpha$  da

PKC que é a forma majoritária detectada no *T. cruzi* sendo uma das principais PKC conhecidas por ser ativada por PMA e  $Ca^{++}$  (Gómez *et al.*, 1999). Outra questão interessante abordada aqui é o papel da PKC na modulação da  $Na^+$ -ATPase e a interferência da miltefosina na atividade da PKC do *T. cruzi*. O envolvimento da PKC no crescimento do *T. cruzi*, bem como na invasão das células hospedeiras por parasitas já foi demonstrado (Einicker-Lamas *et al.*, 2000; Villalta *et al.*, 1999). Em estudos recentes também foi demonstrado que a PKC modula positivamente a captação de *myo*-inositol no *T. cruzi* (Einicker-Lamas *et al.*, 2007). Além disso, é sabido que em células de mamíferos a PKC modula positivamente transportadores de íons, como a  $Na^+$ -ATPase insensível a ouabaína (De Souza *et al.*, 2007b). No presente trabalho, ao contrário do que ocorre em células de mamíferos, foi observado que a ativação da PKC na fração de membrana do *T. cruzi* por PMA inibiu a atividade  $Na^+$ -ATPase, abrindo novas possibilidades para a compreensão do papel da PKC na homeostase de íons do *T. cruzi*.

No *T. cruzi*, observou-se que a miltefosina parece inibe a via de Greenberg para a síntese *de novo* de fosfatidilcolina a partir da fosfatidiletalona, e inibe a atividade da C-22 esterol desaturase, indicando um efeito secundário na alteração da composição de fosfolípidos (Lira *et al.*, 2001). A observação de que a miltefosina inibe, em células de mamíferos, a atividade PKC,  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase (Brachwitz e Vollgraf, 1995) e fosfolipase C- $\beta$  (Ward *et al.*, 2003), sugere que esta droga pode ter uma ampla ação também em *T. cruzi* incluindo transporte de íons e sinalização celular. Esta hipótese é apoiada pela observação de que a miltefosina inibe tanto a atividade PKC quanto a  $Na^+$ -ATPase na fração de membrana do *T. cruzi*. No entanto, estes efeitos não são correlacionados sugerindo mesmo um amplo efeito da miltefosina sobre o parasito.

O efeito inibitório da miltefosina sobre a atividade da  $Na^+$ -ATPase é completamente revertido por diluição da droga, indicando que este composto não forma uma ligação covalente com a enzima. Além disso, a observação de que o efeito inibitório da miltefosina é completamente revertido quando utilizado deoxicolato de sódio, em associação com o bem conhecido efeito da miltefosina

sobre a síntese de fosfolipídios, poderia indicar que o efeito da miltefosina sobre a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase pode ser devido a mudanças na interação entre a proteína e fosfolipídios de membrana (Shoji *et al.*, 1991). Esta hipótese está em consonância com a observação de que a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase das células de mamíferos é modulada positivamente pela interação com fosfolipídios de membrana (Marín *et al.*, 1985). Além disso, foi proposto que o  $\text{Ca}^{++}$  estabiliza a interação entre fosfolipídios e a  $\text{Na}^+$ -ATPase aumentando a atividade da enzima (Marín *et al.*, 1985; Caruso-Neves *et al.*, 1998). No presente trabalho, foi observado que a remoção do cálcio aumenta o efeito da miltefosina que inibe mais a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase.

A possibilidade de que o efeito inibitório da miltefosina sobre a atividade PKC é uma consequência da inibição anterior da PLC- $\beta$  pode ser excluída, porque foi demonstrado que a miltefosina inibe ambas as atividades da PKC: basal (atividade sensível a calfofostina C) e estimulada por PMA (análogo de diacilglicerol). Assim, pode-se postular que miltefosina modula negativamente e diretamente a atividade PKC em *T. cruzi*. Esta possibilidade é apoiada pela observação, em células de mamíferos, que a inibição da atividade PKC por miltefosina é competitiva em relação à fosfatidilserina (Shoji *et al.*, 1991).

Em conjunto, estes resultados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação da  $\text{Na}^+$ -ATPase recentemente clonada em *T. cruzi*, e indicam que esta enzima e também a PKC são possíveis alvos para a ação tripanocida da miltefosina sobre o parasita.

Durante a fase aguda da doença de Chagas, o estabelecimento do processo inflamatório é crucial para o controle do *T. cruzi* nos tecidos alvo e para o estabelecimento do equilíbrio entre parasito e hospedeiro. Entretanto, entre 25 a 30% dos pacientes a inflamação cardíaca é progressiva durante a fase crônica da doença, levando à miocardite (Tarleton, 2001).

Em nossos experimentos com animais BALB/c infectados com *T. cruzi* cepa Y, verificamos através da utilização do método clássico de contagem direta de parasitos no sangue, que o tratamento com benzonidazol e miltefosina suprimiu de maneira bastante eficaz os parasitas circulantes no sangue desses animais.

Através da análise histopatológica e imunohistoquímica do coração, após 15 dias de infecção, foi observado um aumento do número de células de infiltrados inflamatórios por campo e a presença do parasito nos animais não tratados. Esses dados justificam o aumento da inflamação devido à presença do parasito corroborando com os dados já descritos na literatura (Tarleton, 2001; Dos Reis, *et al.*, 2005). Já nos camundongos submetidos a ambos os tratamentos, foram evidenciados uma baixíssima quantidade de infiltrados inflamatórios e a ausência dos ninhos de amastigotas.

Na doença de Chagas, como em qualquer doença infecciosa, há um estímulo da proliferação de linfócitos periféricos durante a infecção pelo *T. cruzi* (Savino *et al.*, 2007). Tanto as células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> estão envolvidas no controle da infecção pelo *T. cruzi*, como demonstrado pela elevada susceptibilidade de camundongos que não possuem as subpopulações de células T inteiramente competentes, tais como camundongos “knock-out” para  $\beta_2$ -microglobulina e para moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I ou II (Tarleton *et al.*, 1992; 1996). Células T CD4<sup>+</sup>, parasita-específicas, inibem a replicação do *T. cruzi in vitro* (Hoft *et al.*, 2000) e conferem proteção contra desafio letal *in vivo* (Kumar e Tarleton, 2001). Estes resultados indicam um papel crucial das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no controle da infecção pelo *T. cruzi* em ambas as fases aguda e crônica (Martin e Tarleton, 2005).

Através de imunohistoquímica, foram quantificados o número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do infiltrado inflamatório cardíaco dos camundongos BALB/c infectados com o *T. cruzi* onde níveis equivalentes dessas células foram observados, como previamente descritos por Higuchi e colaboradores (2003) em biopsias de coração chagásico humano. Tanto os animais tratados com benzonidazol quanto os animais tratados com miltefosina tiveram uma diminuição significativa do número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> acompanhando a diminuição do número total de células inflamatórias.

A migração dos linfócitos para o tecido alvo é dependente da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e componentes da matriz extracelular (Lannes-Vieira, 2003). Moléculas CD62L, LFA-1 e VLA-4 estão

diretamente relacionadas ao processo de migração dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para o sítio inflamatório e camundongos infectados com *T. cruzi* apresentam um fenótipo de ativação CD62L<sup>baixo</sup>/LFA-1<sup>alto</sup>/VLA-4<sup>alto</sup> para essas células inflamatórias (Lannes-Vieira, 2003). Células com fenótipo CD62L<sup>baixo</sup> produzem IFN- $\gamma$  na fase aguda da infecção (Martin e Tarleton, 2005).

Moléculas CD2 são proteínas expressas em praticamente todas as linhagens de células T e células NK (Ortaldo *et al.*, 2007). Essas moléculas possuem diferentes ligantes em roedores (CD48) e humanos (CD58) (Evans *et al.*, 2006; Kearney *et al.*, 2007). As interações do CD2 com CD58 em seres humanos, ou com CD48 em roedores, facilita a adesão entre células T e células apresentadoras de antígeno (APC), e promovem uma interação intercelular adequada para a interação do complexo peptídeo-MHC presente na superfície da APC com o receptor de célula T (TCR) presente na superfície do linfócito T (Wang *et al.*, 1999). Concomitantemente com a sua função de molécula de adesão, o CD2 desempenha um papel no processo de transdução sinal. Sabe-se que a estimulação do CD2 induz a proliferação de células T em ratos e humanos (Meuer *et al.*, 1984; Clark *et al.*, 1988).

Em estudos recentes foram analisados pacientes com Leishmaniose visceral onde foi observada uma menor expressão de moléculas CD2, acompanhada de menor número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando comparados a pacientes sem Leishmaniose visceral. Embora as duas linhagens de células T tenham uma menor expressão de CD2 a redução na expressão dessa molécula foi mais acentuada nas células T CD4<sup>+</sup> (Bimal *et al.*, 2007). A ativação de CD2 tem um forte impacto sobre células CD4<sup>+</sup>, que são ativadas e são majoritariamente produtoras de IFN- $\gamma$  durante a infecção por *Leishmania*. Também foi demonstrado que linfócitos T têm sua ativação reforçada para a secreção de IFN- $\gamma$  na ausência da APC e que uma estimulação do CD2 era necessária para este efeito (Meinl *et al.*, 2000).

Apesar do indiscutível envolvimento de moléculas CD2 nos processos de ativação de células T, que são fundamentais na patogênese da doença de

Chagas, nada tem sido descrito sobre a participação dessa molécula no estabelecimento do processo inflamatório durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Neste trabalho, foi feita a análise do fenótipo dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para moléculas CD62L e LFA-1 e para a molécula de ativação CD2 de células isoladas do baço e do coração dos camundongos BALB/c infectados com o *T. cruzi*. Embora haja uma drástica redução na infiltração inflamatória cardíaca nos animais tratados, a citometria de fluxo permite analisar amostras extensas de tecido de vários camundongos, enriquecendo a quantidade de células T para o estudo. Foi observado que as células T isoladas do tecido cardíaco dos animais infectados e não tratados, apresentaram-se na sua maioria como CD62L<sup>-/+ (baixo)</sup>/LFA-1<sup>+(alto)</sup>/CD2<sup>+(alto)</sup>. Porém, após os tratamentos, houve uma modulação desse fenótipo que pode ser correlacionado com alterações funcionais dessas células. Após o tratamento com benzonidazol houve uma alteração principalmente relacionada à expressão de LFA-1 nas células T CD8<sup>+</sup>, pois as células CD4<sup>+</sup> se mantiveram CD62L<sup>-ou+ (baixo)</sup>/LFA-1<sup>-</sup>/CD2<sup>+(alto)</sup> já a maioria das células CD8<sup>+</sup> foi CD62L<sup>-/+ (baixo)</sup>/LFA-1<sup>+(alto)</sup>/CD2<sup>+(alto)</sup> (dados não demonstrados). O LFA-1 é uma integrina muito importante na adesão de células T à APC e ao endotélio ativado, na indução de apoptose, secreção de citocinas, citotoxicidade e proliferação (Xingyuan *et al.*, 2006).

O CD2 e o LFA-1 são moléculas tão importantes na atividade efetora imune de células T que atualmente são alvos promissores de diversas terapias moleculares no tratamento de autoimunidades e inflamação crônica (Chamian *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2007). Estas terapias em geral consistem na aplicação de anticorpos neutralizantes específicos contra a molécula ou de ligantes recombinantes que competitivamente bloqueiam sua atividade. Ótimos resultados têm sido alcançados, por exemplo, no controle da psoríase, pois com o silenciamento da atividade das células T há uma melhora clínica muito grande nos sintomas (Chamian *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2007). Com relação aos nossos resultados, observamos as maiores modulações nas células T cardíacas após o tratamento com miltefosina. O fenótipo da célula T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> passou a CD62L<sup>-/+ (baixo)</sup>/LFA-1<sup>-</sup>/CD2<sup>-</sup> (dados não demonstrados) e isso pode ser reflexo da clivagem

das moléculas na superfície celular e ou internalização para a degradação em lisossomos, possivelmente associado a uma redução na síntese. Estes dados que sugerem o silenciamento ou redução da atividade efetora celular podem ter um paralelo com dados publicados por Tarleton *et al* (2003). Neste artigo foi mostrado que as células TCD8<sup>+</sup> isoladas do coração de animais crônicos têm sua produção de IFN- $\gamma$  e atividade citotóxica *in vitro* muito reduzida em relação as células de baço.

A diminuição do dano cardíaco pôde ser avaliada comparando-se a atividade CK-MB dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os animais infectados e tratados com benzonidazol ou miltefosina, como esperado, devido a ausência de amastigotas, a diminuição da inflamação e a mudança do fenótipo das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> do coração apresentaram uma atividade CK-MB similar a dos animais normais indicando que o tecido cardíaco foi preservado.

Pode-se concluir que os resultados apresentados aqui contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos de regulação da Na<sup>+</sup>-ATPase do *T. cruzi* recentemente clonada, e aponta essa enzima e a PKC como possíveis alvos da ação tripanocida da miltefosina. Assim como o benzonidazol, a miltefosina age diretamente sobre o *T. cruzi* diminuindo a carga parasitária durante a fase aguda da infecção em modelo murino e, além da diminuição da carga parasitária, os efeitos imunomodulatórios da miltefosina e do benzonidazol previnem a injúria do tecido cardíaco ocasionada pela inflamação. Aparentemente o tratamento com benzonidazol e miltefosina modula negativamente a expressão de moléculas de superfície das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> envolvidas com o processo de migração dessas células para o sítio inflamatório e, além disso, o tratamento com miltefosina demonstra uma diminuição do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando moléculas CD2<sup>+</sup> dos linfócitos residentes no coração, sugerindo que essas células do infiltrado inflamatório estejam menos ativadas que as observadas nos animais infectados, e infectados e tratados com benzonidazol.

As doenças negligenciadas são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo. Além das dificuldades na elaboração e fornecimento de medicamentos adequados, específicos para cada doença, muitos outros fatores



contribuem para a prevalência dessas enfermidades. O extremo interesse comercial, das indústrias farmacêuticas que visa preferencialmente a implementação de drogas que dêem muito lucro, e a falta de iniciativa dos governos são dois fatores que contribuem para o desenvolvimento das doenças negligenciadas, entre elas a doença de Chagas.

Através da adoção de um programa de combate ao inseto transmissor do *T. cruzi*, a prevalência Global da doença de Chagas foi reduzida a partir de 1990, com redução do número de estimado de pessoas infectadas caindo de 16-18 milhões para 9 milhões na América Latina (Schofield *et al.*, 2006). Porém, segundo as últimas estimativas da OMS, ainda são registrados cerca de 670.000 novos casos por ano no mundo (WHO, 2004). Apesar do grande número de pacientes infectados com o *T. cruzi* não existem drogas que sejam eficazes contra o parasito na fase aguda e crônica da doença. A eficácia do benzonidazol e do nifurtimox foi observada durante a fase aguda da doença de Chagas, porém essa eficácia não é observada na fase crônica da infecção (Stoppani, 1999). Além disso, cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes a essas drogas já foram identificadas (Murta *et al.*, 1998). Embora tenha sido identificada resistência de um isolado de *Leishmania tropica* à miltefosina devido a super-expressão de uma glicoproteína-P (Perez-Victoria *et al.*, 2001), até o momento não há descrição de amostras de *T. cruzi* que apresentem resistência à miltefosina, sendo esta uma observação importante nos trabalhos sobre quimioterapia de infecções parasitárias (Croft *et al.*, 2003).

Como perspectiva, estratégias alternativas estão sendo concebidas para identificar possíveis drogas que possam ser usadas com efeito sinérgico, tal como observado através da combinação do benzonidazol e cetoconazol para melhorar a eficácia da terapia experimental da doença de Chagas (Araujo *et al.*, 2000). Estudos preliminares realizados *in vitro* demonstraram um efeito sinérgico de alguns alquilfosfolipídios e cetoconazole na atividade anti-proliferativa contra o *T. cruzi* (Santa-Rita *et al.*, 2005). E mais precisamente com relação à miltefosina, apesar dela não ter sido capaz de interagir com o estibogluconato de sódio, já foi demonstrado que a droga é capaz de interagir *in vitro* e *in vivo* com algumas outras drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose como a anfotericina B e

paromomicina (Seifert e Croft, 2006). Nesse contexto, devido aos diferentes mecanismos de ação do benzonidazol e da miltefosina contra o *T. cruzi* e de acordo com os resultados promissores apresentados aqui, pode-se propor que um possível sinergismo entre benzonidazol e miltefosina poderia levar a um aumento na eficiência da terapia de pacientes chagásicos crônicos ou infectados com cepas resistentes ao tratamento com benzonidazol.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos de regulação da Na<sup>+</sup>-ATPase do *T. cruzi* recentemente clonada, e apontam essa enzima e a PKC como possíveis alvos da ação tripanocida da miltefosina. A caracterização da Na<sup>+</sup>-ATPase insensível à ouabaína e sensível à furosemida demonstrou que a sua atividade encontra-se majoritariamente associada à uma fração enriquecida de membrana de formas epimastigotas, tem um pH ótimo de 6-7, e é estimulada na presença de Ca<sup>++</sup>. Esta atividade Na<sup>+</sup>-ATPase parece desempenhar um papel importante no crescimento do parasita uma vez que a proliferação de formas epimastigotas foi inibida de maneira dose-dependente pela furosemida. Os resultados mostraram que, ao contrário do observado em mamíferos, a atividade PKC residente e estimulada por PMA de *T. cruzi* não é capaz de estimular a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase, mas parece sim ser capaz de inibi-la. Assim como o benzonidazol, a miltefosina age diretamente sobre o *T. cruzi* diminuindo a carga parasitária durante a fase aguda da infecção com a cepa Y em modelo murino. Os efeitos imunomodulatórios da miltefosina e do benzonidazol previnem a injúria do tecido cardíaco ocasionada pela inflamação. O tratamento com miltefosina provoca uma diminuição do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando moléculas CD2<sup>+</sup> dos linfócitos residentes no coração, sugerindo que essas células do infiltrado inflamatório estejam menos ativadas que as observadas nos animais infectados e não tratados, e daqueles infectados e tratados com benzonidazol. As dosagens plasmáticas do isotipo cardíaco de creatina quinase confirmaram a manutenção da integridade do tecido cardíaco dos animais infectados e tratados com benzonidazol ou miltefosina.

## 7. Referencias Bibliográficas

- 1- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol.* **100**: 269-275
- 2- Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG (1985). Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res.* **18** :499-506.
- 3- Andrade, SG (1974). Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.* **1**: 65-121.
- 4- Andrews NW, Katzin AM. e Colli W. (1984). Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional eletrophoresis. *Eur. J. Biochem.* **140**: 599-604.
- 5- Araújo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z. (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother.* **6**:819-824.
- 6- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZM, Moreira MC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. (2000). Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis.* **2**: 634-638.
- 7- Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey, DG, Teixeira R, Almeida de Souza, JA e Sherlock, IA. (1980). Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**: 84-90.
- 8- Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM. 2007. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun.* **363**: 828-834.

- 9- Benchimol-Barbosa PR. (2006). The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.* **112**:132-133.
- 10- Berens RL, Marr JJ, Steele da Cruz FS, Nelson DJ. (1982). Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrob Agents Chemother.* **4**: 657-661
- 11- Bimal S, Singh SK, Sinha S, Pandey K, Sinha PK, Ranjan A, Bhattacharya SK, Das P. (2007). *Leishmania donovani*: Role of CD2 on CD4(+) T-cell function in Visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol.* **118**: 238-246.
- 12- Blanco G, Mercer RW. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* **275**: 633-650
- 13- Borst P e Ouellett M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 427-460.
- 14- Boumendil-Podevin EF, Podevin RA. (1983). Effects of ATP on Na<sup>+</sup> transport and membrane potential in inside-out renal basolateral vesicles. *Biochim Biophys Acta.* **728**: 39-49
- 15- Brachwitz H e Vollgraf C (1995). Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmac. Ther.* **66**: 39-82.
- 16- Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **27**:347-382
- 17- Brener Z e Gazzinelli RT. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* **114**:103-110

- 18- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* **104**: 219-232.
- 19- Burleigh BA e Woolsey AM. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* **4**: 701-711.
- 20- Burleigh BA. (2005). Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci STKE.* **293**: 36
- 21- Cardoso de Almeida ML e Heise N. (1993). Proteins anchored via GPI and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Res.* **26**: 285-312.
- 22- Caruso-Neves C, Einicker-Lamas M, Chagas C, Oliveira MM, Vieyra A e Lopes AG. (1998). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes express the ouabain- and vanadate-sensitive (Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>)ATPase activity. *Z. Naturforsch.* **53**: 1049-1054.
- 23- Caruso-Neves C, Einicker-Lamas M, Chagas, C, Oliveira MM, Vieyra A and Lopes AG. (1999). Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Z. Naturforsch.* **54**: 100-104.
- 24- Caruso-Neves C, Coelho-Souza SA, Vives D, Goes G, Lara LS, Lopes AG. (2002). Modulation of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg(2+), MgATP and furosemide. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**:1586-93.
- 25- Chagas, C. (1909). Nova Trypanosomíase humana. Estudos, morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen. n. sp. Agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **1**: 159-218.
- 26- Chamian F, Lin SL, Lee E, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Cardinale I, Khatcherian A, Novitskaya I, Wittkowski KM, Krueger JG,

- Lowes MA. (2007). Alefacept (anti-CD2) causes a selective reduction in circulating effector memory T cells (Tem) and relative preservation of central memory T cells (Tcm) in psoriasis. *J Transl Med.* 5:27
- 27- Clark SJ, Law DA, Paterson DJ, Puklavec M, Williams AF. (1988). Activation of rat T lymphocytes by anti-CD2 monoclonal antibodies. *J Exp Med.* **167**:1861-1872.
- 28- Clark CG. e Pung OJ. (1994). Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**: 175-179.
- 29- Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV. e Deeley RG. (1992). Overexpression of transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* **258**: 1650-1654.
- 30- Coura JR, Naranjo MA, Willcox HP (1995). Chagas' disease in the Brazilian Amazon. II. A serological survey. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **37**:103-107
- 31- Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O. (1999). Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94**: 379-384
- 32- Coura, R. J. & De Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 3-24.
- 33- Coura JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **102**:113-122.
- 34- Croft, SL, Neal RA, Pendergast W e Chan JH. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 2633-2636

- 35- Croft SL, Neal RA, Thornton EA e Herrmann DB. (1993). Antileishmanial activity of the ether phospholipid ilmofosine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 217-219.
- 36- Croft SL, Snowdon D. e Yardley V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**: 1041-1047.
- 37- Croft SL, Seifert K e Duchêne M. (2003). Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**: 165-172.
- 38- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 508-512.
- 39- D' Império Lima, MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz, M. e Coutinho, A. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* **137**: 353-356.
- 40- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375-382.
- 41- de Almeida-Amaral EE, Caruso-Neves C, Lara LS, Pinheiro CM, Meyer-Fernandes JR. (2007). *Leishmania amazonensis*: PKC-like protein kinase modulates the (Na<sup>++</sup>K<sup>+</sup>) ATPase activity. *Exp Parasitol.* **116**: 419-426.
- 42- de Castro SL. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **53**: 83-98.
- 43- de Castro SL, Santa-Rita RM, Urbina JA, Croft SL. (2004). Antiprotozoal lysophospholipid analogues: a comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumor cells. *Mini Rev Med Chem.* **2**:141-151.



- 44- De Souza AM, Batista EJ, Pinheiro AA, Carvalhaes M, Lopes AG, De Souza W, Caruso-Neves C. (2007a). *Entamoeba histolytica*: ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity. *Exp Parasitol.* **2**:195-200.
- 45- De Souza AM, Carvalho TL, Sabino PM, Vives D, Fontes CF, Lopes AG, Caruso-Neves C. (2007b). Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie.* **89**:1425-1432.
- 46- Devera R, Illarramendi X, Montoya-Araújo R, Pirmez C, Fernandes O, Coura JR. (2003). Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop.* **35**:323-30.
- 47- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.* **3**:251-261
- 48- Docampo R, Scott, DA, Vercesi, A. E. e Moreno SNJ. (1995). Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **310**:1005–1012
- 49- Docampo R e Moreno SN. (2001). Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. *Curr. Drug. Targets Infect. Disord.* **1**: 51-61.
- 50- Dos Reis GA, Peçanha LM, Bellio M, Previato JO e Mendonça-Previato L. (2002). Glycoinositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* transmit signals to the cells of the host immune system through both ceramide and glycan chains. *Microbes Infect.* **4**: 1007-1013.
- 51- Dos Reis GA., Freire-de-Lima CG., Nunes MP. Lopes MF. (2005). The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *TRENDS in Parasitology.* **21**: 237-243

- 52- Duncan MJ, Li G, Shin JS, Carson JL, Abraham SN. (2004). Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. *J Biol Chem.* **279**:18944-18951.
- 53- Einicker-Lamas M, Almeida AC, Todorov AG, de Castro SL, Caruso-Neves C, Oliveira MM. (2000). Characterization of the myo-inositol transport system in *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem.* **267**: 2533-2537.
- 54- Einicker-Lamas M, Nascimento MT, Masuda CA, Oliveira MM, Caruso-Neves C. 2007. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: regulation of myo-inositol transport by effectors of protein kinases A and C. *Exp Parasitol.* **117**:171-177.
- 55- Escobar P, Yardley V, Croft SL. (2001). Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:1872-1875
- 56- Escobar P, Matu S, Marques C e Croft SL. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* **81**: 151-157.
- 57- Evans EJ, Castro MA, O'Brien R, Kearney A, Walsh H, Sparks LM, Tucknott MG, Davies EA, Carmo AM, van der Merwe PA, Stuart DI, Jones EY, Ladbury JE, Ikemizu S, Davis SJ. (2006). Crystal structure and binding properties of the CD2 and CD244 (2B4)-binding protein, CD48. *J Biol Chem.* **39**: 29309-20.
- 58- Fernandes MC, L'Abbate C, Kindro Andreoli W, Mortara RA. (2007). *Trypanosoma cruzi* cell invasion and traffic: influence of *Coxiella burnetii* and pH in a comparative study between distinct infective forms. *Microb Pathog.* **43**:22-36.
- 59- Feschenko MS, Sweadner KJ. (1994). Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. *J Biol Chem.* **269**: 30436-30444

- 60- Filard, LS e Brener Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 755-759.
- 61- Fischer C, Voss A. e Engel J. (2001). Developmental status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 85-87.
- 62- Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S. (2005). Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol.*; **60**: 33-37.
- 63- Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1521-1528.
- 64- Gil, JR, Soler A, Azzouz S, Osuna A. (2003). Ion regulation in the different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **90**: 268-272.
- 65- Goad LJ, Berens RL, Marr JJ, Beach DH, Holz GG Jr. (1989). The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* **32**:179-189.
- 66- Gómez ML, Ochatt CM, Kazanietz MG, Torres HN, Téllez-Iñón MT. (1999). Biochemical and immunological studies of protein kinase C from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* **29**: 981-989.
- 67- Gutteridge WE.; Cover B e Dvaborak MA (1978). Jax inbred mice in chemotherapeutic investigations of experimental Chagas' disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 329-335.

- 68- Haider AS, Lowes MA, Gardner H, Bandaru R, Darabi K, Chamian F, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Whalen MS, Cardinale I, Novitskaya I, Krueger JG. (2007). Novel insight into the agonistic mechanism of alefacept in vivo: differentially expressed genes may serve as biomarkers of response in psoriasis patients. *J Immunol.* **178**: 7442-9
- 69- Hampton RY, Morand OH. (1989). Sphingomyelin synthase and PKC activation. *Science.* **246**(4933):1050
- 70- Hannun YA, Obeid LM. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci.* **20**:73-77
- 71- Henriques-Pons A, Olivieri BP, Oliveira GM, Daëron M, de Araújo-Jorge TC. (2005) Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* increases the population of CD8(+), but not CD4(+), immunoglobulin G Fc receptor-positive T lymphocytes. *Infect Immun.*; **73**: 5048-5052
- 72- Higgins CF. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**: 67-113.
- 73- Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* **60**: 96-107.
- 74- Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST. (2000). Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **68**1:197-204
- 75- Iizumi K, Mikami Y, Hashimoto M, Nara T, Hara Y, Aoki T. (2006). Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* **1758**: 738-746
- 76- Jones C, Todeschini AR, Agrellos OA, Previato JO, Mendonça-Previato L. (2004). Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glycans from

- Trypanosoma cruzi* tulahuen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides. *Biochemistry*. **37**:11889-11897.
- 77- Kato M, Ozawa S, Hayashi R. 1997. Effects of high pressure and temperature on micelle formation of sodium deoxycholate and sodium dodecylsulfate. *Lipids*. **32**:1229-1230
- 78- Kearney A, Avramovic A, Castro MA, Carmo AM, Davis SJ, van der Merwe PA. (2007). The contribution of conformational adjustments and long-range electrostatic forces to the CD2/CD58 interaction. *J Biol Chem*. **282**:13160-13166.
- 79- Kuhlencord A, Maniera T, Eibel H e Unger C. (1992). Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral Leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. **36**: 1630-1634.
- 80- Kumar R, Kline IK, Abelmann WH. (1969). Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis: relative effects upon the right and left ventricles. *Am J Pathol*. **57**: 31-47
- 81- Kumar S, Tarleton RL. (2001). Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*. **166**:4596-4603
- 82- Lannes-Vieira J. (2003). *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **98**:299-304.
- 83- Lauria-Pires L, Nitz N, Vexenat AC.; Arganaraz ER, D' Souza-Ault M, Nascimento RJ, Tinoco DL e Teixeira, ARL. (2001). The treatment of Chagas' disease patients with nitroderivative is unsatisfactory. *Rev. Inst. Trop. São Paulo* **43**: 175-181.

- 84- Leavey JK e Tarleton RL. (2003). Cutting Edge: Dysfunctional CD8+ T Cell Reside in Nonlymphoid Tissues During Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol.* **170**: 2264-2268.
- 85- Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dardenne M, Savino W. (1992). Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* **77**:95-98
- 86- Lewis, K. (1994). Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends. Biochem. Sci.* **19**: 119-123.
- 87- Ley V, ES Robbins, V Nussenzweig, NW Andrews. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* **171**: 401–413
- 88- Lira R, Contreras LM, Santa-Rita R e Urbina J. (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity of sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 537-546.
- 89- Lowry, OH, Rosenbrough, NJ Farr AL e Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- 90- Luquetti AO. (1999). Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94**: 283-284.
- 91- Lux, H, Hart DT, Parker PJ e Klenner T (1996). Ether-lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmania alkyl-phospholipid analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **406**: 201-211.
- 92- Lux H, Heise N, Klenner T, Hart DT e Opperdoes FR. (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**: 1-14.

- 93- Luz MR, van-Leuven F e Araújo-Jorge TC (1995). Heterogeneity on the synthesis of  $\alpha$ -macroglobulins in outbred Swiss albino mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **81**: 662-667.
- 94- Málaga S, Yoshida N. (2001). Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun.* **69**: 353-359.
- 95- Malaquias AT, Oliveira MM. (1999). Phospholipid signalling pathways in *Trypanosoma cruzi* growth control. *Acta Trop.* **73**: 93-108
- 96- Marín R, Proverbio T, Proverbio F (1985). Characterization of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of basolateral plasma membranes of kidney proximal tubular cells from young and old rats. *Biochem Pharmacol.* **34**: 4197-4201.
- 97- Martin DL, Tarleton RL. (2005). Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.*; **174**: 1594-1601.
- 98- Massad E. (2007). The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect.* **4**:1-12
- 99- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **146**: 601-620.
- 100- Meinl E, Lengenfelder D, Blank N, Pirzer R, Barata L, Hivroz C. (2000). Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *J Immunol.* **165**: 3578-3583.
- 101- Melo RC, Brener Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol.* **64**: 475-82.

- 102- Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald KA, Hodgdon JC, Protentis JP, Schlossman SF, Reinherz EL. (1984). An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell*. **36**:897-906
- 103- Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT. (1998). Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. **10**:2549-56.
- 104- Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC E Godfrey DG (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**: 217-225
- 105- Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R E Toyé PJ. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* **272**: 819-821.
- 106- Miles MA, BW, Widmer G, Pova MM. e Schofield CJ. (1984). Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 526-535
- 107- Miles MA, Feliciangeli MD e de Arias AR (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* **326**: 1444-1448.
- 108- Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol.* **6**: 661-8.
- 109- Minóprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M. e Coutinho A. (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* **28**: 553-561.



- 110- Miyahira Y. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8(+) T cell immunity - An infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int.* **1**:38-48.
- 111- Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. (2000). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother.* **1**:150-155
- 112- Moller JV, Juul B, le Maire M (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta.* **1286**:1-51
- 113- Moncayo, A. (1999). Progress towards the elimination of transmission of Chagas' disease in Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: 401-404.
- 114- Moreno SN, Docampo R. (2003) Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol.* **4**:359-64
- 115- Muñoz-Martínez F, Torres C, Castanys S, Gamarro F. (2008). The anti-tumor alkylphospholipid perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* **2** :530-540.
- 116- Murray HW. e Delph-Etienne (2000). Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in t cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J Infect Dis.* **181**:795–799.
- 117- Murray, H. W.; Jungbluth, A.; Ritter, E.; Montelibano, C & Marino, M. W. (2000). Visceral Leishmaniasis in Mice Devoid of Tumor Necrosis Factor and Response to Treatment. *American Society for Microbiology.* 6289–6293.

- 118- Murray HW. (2002). Kala-azar – Progress against a neglected disease. *N. Engl. J. Med.* **347**: 1793-1794.
- 119- Murta, S. M. F.; Gazzinelli, R. T.; Brener, Z. e Romanha, A. J. (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**: 203-214.
- 120- Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ. (1999). In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunol.* **21**: 535-44.
- 121- Murta, S. M.; dos Santos W. G.; Anacleto, C.; Nirde, P.; Moreira, E. S. e Romanha, A. J. (2001). Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**: 223-228.
- 122- Neal, R. A. & van Bueren, J. (1988). Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* *in vitro* and *in vivo*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 709-714.
- 123- Neira I, Ferreira AT, Yoshida N. (2002). Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int J Parasitol.* **4**:405-14.
- 124- O'Grady SM, Palfrey HC, Field M. (1987). Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. *Am J Physiol.* **253**: 177-192.
- 125- Okumura M, Aparecida dos Santos V, Camargo ME, Schultz R, Zugaib M. (2004). Prenatal diagnosis of congenital Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Prenat Diagn.* **24**:179-81
- 126- Ortaldo JR, Mason A, Willette-Brown J, Ruscetti FW, Wine J, Back T, Stull T, Bere EW, Feigenbaum L, Winkler-Pickett R, Young HA. (2007).

- Modulation of lymphocyte function with inhibitory CD2: loss of NK and NKT cells. *Cell Immunol.* **249**: 8-19.
- 127- Perez-Victoria, J. M.; Perez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S. & Gamarro, F (2001). Alkyl-phospholipids resistance in multi drug resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glicoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2468-2474.
- 128- Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. (2003). Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem.* **278**: 49965-49971.
- 129- Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F. (2006). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *Leishmania donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem.* **281**: 23766-75.
- 130- Postan M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. (1987). Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg.* **37**: 541-549.
- 131- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* **2**:92-100.
- 132- Previato, J. O.; Andrade, A. F. B.; Dos Reis, G. A. e Mendonça-Previato, L. (1991). *In vivo* and *in vitro* *Trypanosoma cruzi* cells acquire sialic acid residues from their environment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **86**: 53-54.
- 133- Previato, JO, Jones C, Xavier MT, Wait R, Travassos LR, Parodi AJ e Mendonça-Previato L. (1995). Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. *J. Biol. Chem.* **270**: 7241-7250.

- 134- Proverbio, F, Proverbio, T, Marín, R. (1986). Na<sup>+</sup>-ATPase is a different entity from the (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*. **858**: 202-205.
- 135- Rangel LB, Malaquias AT, Lara LS, Silva IV, De Souza AM, Lopes AG, Caruso-Neves C. (2001). Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na<sup>(+)</sup>-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim Biophys Acta*. **1512**: 90-97.
- 136- Revelli S, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O. (1999). Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol*. **118**: 271-277.
- 137- Rodriguez; J. B. (2001). Specific molecular targets to control tropical diseases. *Curr. Pharm. Des*. **7**: 1105-1116.
- 138- Romanha AJ, da Silva Pereira AA, Chiari E. e Kilgour V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol*. **62**: 139-142.
- 139- Romanha AJ, Alves RO, Murta SM, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT. 2002. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis*. **186**: 823-828.
- 140- Rossi MA, Ribeiro-dos-Santos R e Gonçalves S. (1986). Pathogenesis of the apical aneurysm in experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in Balb/c mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **80**: 990-991.
- 141- Rossi MA, Ramos SG. (1996). Coronary microvascular changes in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. **66**:169-172
- 142- Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. *Biochem J*. **330**: 505-511

- 143- Ruiz, FA, Rodrigues, CO. e Docampo R. (2001). Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **276**, 26114–26121
- 144- Russo, M; Starobinas, N.; Ribeiro-dos-Santos R.; Minoprio, P; Eisen, H. e Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1989). Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infection with myotropic strains *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **11**: 385-395.
- 145- Santa-Rita, RM, Barbosa HS, Meirelles MN e de Castro SL. (2000). Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **75**: 219-228.
- 146- Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. (2005). Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother.* **55**: 780-784.
- 147- Santa-Rita RM, Barbosa HS, de Castro SL. 2006. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **100**: 187-190.
- 148- Saraiva VB, Gibaldi D, Previato JO, Mendonça-Previato L, Bozza MT, Freire-De-Lima CG, Heise N. (2002). Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 3472-3477
- 149- Saraiva VB. (2004). Efeitos tóxicos e possíveis mecanismos de ação da hexadecilfosfocolina (miltefosina) sobre o *Trypanosoma cruzi*: estudos *in vitro* e *in vivo*. *Dissertação de Mestrado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ*.

- 150- Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki Mdel P, Bottasso O, Guiñazú N, Silva-Barbosa SD, Gea S. (2007). Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**: 107-24.
- 151- Schenkman S, Jiane, MS, Hart GW e Nussenweig V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* **65**: 1117-1125.
- 152- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* **22**: 583-588.
- 153- Scott, D. A. e Docampo, R. (2000). Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **275**: 24215–22421.
- 154- Scott DA, Docampo, R, Dvorak JA, Shi S. e Leapman RD. (1997). *In situ* compositional analysis of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol Chem.* **272** 28020–28029.
- 155- Seifert K, Croft SL. (2006). In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 73-79.
- 156- Seifert, K.; Duchene, M.; Wernsdorfer, W. H.; Kolaritsch, H.; Sheiner, O.; Wiedermann, G.; Hopttkowitz, T. e Eibl, H. (2001). Effects of miltefosine and other alkilphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1505-1510.
- 157- Serrano AA, Schenkman S, Yoshida N, Mehler A, Richardson JM e Ferguson MAJ. (1995). The lipid structure of thr glycosylphosphatidilinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotrs to infective metacyclic trypomastigote forms. *J. Biol. Chem.* **270**: 27244-27253.

- 158- Seufferheld M, Vieira MC, Ruiz FA, Rodrigues CO, Moreno SN, Docampo R. (2003). Identification in bacteria of organelles similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **278**: 29971–29978
- 159- Shoji M, Raynor RL, Fleer EA, Eibl H, Vogler WR, Kuo JF. (1991). Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells. *Lipids.* **26**:145-149
- 160- Silva JC, Pirmez C, Morgado MG e Galvão-Castro B. (1985). Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infections. *Parasite Immunol.* **7**: 457-466.
- 161- Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, Engel J. (2004). Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* **4**:173-180.
- 162- Skulachev, V. P. (1994). The latest views from the sodium world. *Biochim. Biophys. Acta.* **1187**: 216-221.
- 163- Sosa R. e Gallerano RH. (1988). Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, Efectos del allopurinol. *Revista federación Argentina de cardiología* **17**: 234-236.
- 164- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA. e Zingales B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-152.
- 165- Stoppani, AOM. (1999). Quimioterapia De La Enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires).* **59**: 147-165.
- 166- Sun J, Tarleton RL. (1993). Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* **48**:161-169

- 167- Sundar, S.; Gupta, L. B.; Makharia, M. K.; Voss, A.; Rosenkaimer F.; Engel, J. & Murray, H. W. (1999). Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93**: 589-597.
- 168- Sundar S, Makharia A, More DK, Agrawal G, Voss A, Fischer C, Bachmann P e Murray HW. (2000). Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 1110-1113.
- 169- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A e Berman J. (2002). Oral miltefosine for Indian leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **347**: 1739-1746.
- 170- Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature.* **356**:338-40
- 171- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol.* **8**:13-22
- 172- Tarleton RL, (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* **31**: 550–554.
- 173- Tibayenc, M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology* . **36**: 47-115.
- 174- Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodríguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. (2005). Endemic level of congenital *Trypanosoma cruzi* infection in the areas of maternal residence and the development of congenital Chagas disease in Bolívia. *Rev Soc Bras Med Trop.* **38**:17-20.
- 175- Unger C, Sindermann H, Peukert M, Hilgard P, Engel J, Eibl H. (1992). Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Prog Exp Tumor Res.* **34**:153-159.



- 176- Urbina JA. (1997). Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*; **114**: 91-99.
- 177- Urbina, J. A.; Payares, G.; Contreras, L. M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P. & Loebenberg, D. (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH56592 against *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1771-1777.
- 178- Urbina, JA Urbina JA, Moreno B, Vierkotter S, Oldfield E, Payares G, Sanoja C, Bailey BN, Yan W, Scott DA, Moreno SN, Docampo R. (1999). *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *J. Biol. Chem.* **274**: 33609–33615
- 179- Urbina JA, Docampo R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **19**: 495-501
- 180- Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. (2003a). *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.* **21**:27-38
- 181- Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ. (2003b). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents.* **21**:39-48.
- 182- Urbina JA. (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg. Suppl* 1:S9-S16.
- 183- Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, de Paula Oliveira R, Chiari E, Moreira MD, Filho GB, Schijman AG, Franco GR, Machado CR, Pena SD, Macedo AM. (2008). Genetic profiling of

- Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol.* [Epub ahead of print]
- 184- van der Goot FG, Harder T. (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol.* **13**: 89-97
- 185- Van Der Heyden N, Docampo R. 1996. Proton and sodium pumps regulate the plasma membrane potential of different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **120**:127-39
- 186- van Veen HW e Konings, WN (1997). Drug efflux proteins in multidrug resistant bacteria. *J. Biol. Chem.* **378**: 769-777.
- 187- Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Pratap S, Burns JM Jr, Lima MF. (1999). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. *Mol Cell Biol Res Commun.* **2**: 64-70
- 188- Wang JH, Smolyar A, Tan K, Liu JH, Kim M, Sun ZY, Wagner G, Reinherz EL. (1999). Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell.* **97**:791-803
- 189- Ward, P. D.; Ouyang, H.; Thakker D. R.; (2003). Role of phospholipase C-beta in the modulation of epithelial tight junction permeability. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **304**: 689-698.
- 190- WHO (World Health Organization). (2002). Technical Report Series. Control of Chagas' disease, ed. W. H. O. Publications, Geneva
- 191- WHO (World Health Organization). (2004). The World Health Organization 2004 Changing history. [www.who.int/whr/2004/en/](http://www.who.int/whr/2004/en/) accessed 19 de novembro de 2007.

- 192- Wieder T, Reutter W, Orfanos CE, Geilen CC. (1999). Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Prog Lipid Res.* **38**: 249-259.
- 193- Wright MM, Howe AG, Zarembeg V. (2004). Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *Biochem Cell Biol.* **82**:18-26.
- 194- Xingyuan M, Wenyun Z, Tianwen W. (2006). Leukocyte function-associated antigen-1: structure, function and application prospects. *Protein Pept Lett.* **13**: 397-400.
- 195- Yoshida N, Favoreto S, Ferreira AT e Manque PM. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz. Med. Biol. Res.* **33**: 269-278.
- 196- Yoshida. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* **78**: 87-111.
- 197- Zingales, B.; Carniol, C.; Lederkremer, R. M. & Colli, W. (1987). Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of tripomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 135-144.
- 198- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* **28**:105-112
- 199- Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94** 1:159-64

**8. ANEXO**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)