

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

**ALINE ARAUJO ZUMA**

**ESTUDO DO EFEITO DE INIBIDORES DE TOPOISOMERASES  
E LIGANTES DE DNA NA PROLIFERAÇÃO E  
ULTRAESTRUTURA DO *Trypanosoma cruzi***

Rio de Janeiro  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Estudo do Efeito de Inibidores de Topoisomerasas e Ligantes de DNA na  
Proliferação e Ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

**Orientador:**

**Dra. Maria Cristina Machado Motta**

**Rio de Janeiro**

**2010**

Zuma, Aline Araujo  
Estudo do Efeito de Inibidores de Topoisomerases e Ligantes de DNA na Proliferação e Ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*.  
/Aline Araujo Zuma. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. 2007.

111 f.

Orientador: Dra. Maria Cristina Machado Motta.  
Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica) –  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

Bibliografia: f. 92-104.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Topoisomerases 3. Inibidores 4. Proliferação 5. Ultraestrutura

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

II. Estudo do Efeito de Inibidores de Topoisomerases e Ligantes de DNA na Proliferação e Ultraestrutura Celular do *Trypanosoma cruzi*

ALINE ARAUJO ZUMA

ESTUDO DO EFEITO DE INIBIDORES DE TOPOISOMERASES E LIGANTES DE  
DNA NA PROLIFERAÇÃO E ULTRAESTRUTURA DO *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Maria Cristina Machado Motta (orientadora)

---

Dr. Norton Heise

---

Dra. Marta Helena Branquinha de Sá

---

Dr. Marcelo Alves Ferreira

---

Dra. Rosane Silva (revisora)

Rio de Janeiro  
2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais e a minha família que sempre acreditaram em mim e comemoraram comigo todas as minhas conquistas.

Agradeço a minha orientadora, professora Maria Cristina Machado Motta, primeiramente por ter me dado a possibilidade de realizar meu mestrado sob a sua orientação. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim. E também pela orientação nestes dois anos de convivência. Agradeço também por toda a sua cumplicidade, compreensão e palavras de incentivo.

Aos meus queridos amigos “Crithidios”: Allan, Carol, Dani Cavalcanti, Felipe, Jaque, Iamara, Thiago Manchester e Paulo por terem me recebido de maneira tão carinhosa. Obrigada por todos os ensinamentos com os experimentos! Sem o bom humor de vocês tudo teria sido, sem dúvida alguma, muito mais difícil!!! Falando em bom humor, não podia deixar de lembrar de todos os apelidos que vocês inventaram: Zu, Zuzu, Zumba, Zupira, Zuzubalândia e por aí vai... Nunca imaginei que um sobrenome de 4 letras pudesse render tantas brincadeiras! Sem falar nas musiquinhas também!!! Obrigada pela amizade e pelo companheirismo de vocês. E por fazerem parte de tantos momentos divertidos e inesquecíveis dentro e fora do laboratório.

Aos demais amigos (tão queridos quanto) do laboratório: Thiago Luiz, Lissa (que reencontrei também vinda da UFF), Claudia Maia, Miguel e Daniela por todo carinho, pela ajuda, pela amizade, pelas brincadeiras e bom humor e, claro, por participarem também dos momentos dos quais vou me lembrar pra sempre.

Obrigada ao Bosco e a Nete por toda a ajuda e pelos momentos de descontração, principalmente na hora de contar células!! E também a Cazuzza, pois sem vocês esse trabalho não seria possível!

A Ana Cristina pelo carinho e por me socorrer sempre que era preciso comprar algum material, me respondendo sempre às mesmas dúvidas...

Aos demais alunos e professores do laboratório que me ajudaram durante a realização deste trabalho.

Ao professor Carlos Renato Machado que me recebeu em seu laboratório na UFMG e que colaborou na discussão dos resultados deste trabalho e sugeriu novas idéias para a continuidade do mesmo.

À professora Rosane Silva pela revisão desta dissertação e pelas sugestões.

Ao professor Saulo Cabral Bourguignon, que me orientou durante a minha iniciação científica, pelo incentivo e pela ajuda ao participar da seleção do mestrado. E também pelos ensinamentos científicos que me deram base para seguir em frente.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

E a Deus, por iluminar meu caminho para que meus desejos se concretizassem.

**Muito obrigada!**

## RESUMO

A família Trypanosomatidae é composta por protozoários de importância médica, tais como: *Leishmania* spp, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, que é o agente etiológico da doença de Chagas. Os tripanosomatídeos apresentam uma mitocôndria única que possui uma região alargada, o cinetoplasto, que contém o DNA (kDNA) distribuído em um arranjo particular de maxicírculos e minicírculos catenados. As DNA topoisomerasas I e II têm um papel importante no controle do estado topológico do DNA. Estas enzimas fazem reversão de superenovelamentos positivos e negativos da dupla fita de DNA durante os processos de replicação, transcrição, recombinação e reparo. Uma vez que estas enzimas apresentam papéis essenciais em processos biológicos, elas constituem um alvo potencial em quimioterapia. Neste trabalho, nós testamos o efeito de diferentes inibidores de topoisomerasas e de drogas ligantes de DNA, na proliferação celular e na ultraestrutura das formas epimastigotas de *T. cruzi* e de *B. culicis*, que foi utilizada como modelo comparativo por apresentar o arranjo do kDNA mais frouxo. Nossos resultados mostraram que os inibidores de topoisomerase I de eucariotos foram os compostos mais ativos no crescimento celular de *T. cruzi*. Entre eles, a camptotecina foi o mais potente inibidor da proliferação celular, também induzindo uma intensa descompactação da heterocromatina nuclear. De outro modo, os inibidores de topo II de procariotos tiveram o cinetoplasto como principal alvo, promovendo re-arranjo ultraestrutural do kDNA em *B. culicis*, mas não em *T. cruzi*. Entretanto, estes compostos afetaram o crescimento celular de ambas as espécies, especialmente da primeira. Considerando os inibidores de topo II de eucariotos, o mitoxantrone foi o que apresentou maior efeito na proliferação celular de *T. cruzi*. Entre os ligantes de DNA, o berenil causou uma notável desorganização do kDNA, ainda não descrita para nenhum outro inibidor testado em tripanosomatídeos. Os resultados obtidos neste trabalho, podem nos ajudar a revelar os mecanismos de ação dos inibidores de topoisomerasas em tripanosomatídeos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; topoisomerasas; inibidores; proliferação; ultraestrutura.

## ABSTRACT

The Trypanosomatidae family includes protozoan of medical importance, such as: *Leishmania* spp, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, which is the etiologic agent of Chagas' disease. Trypanosomatids present an unique mitochondrion with an enlarged portion, the kinetoplast, that contains the DNA (kDNA) distributed in a particular arrangement of catenated maxicircles and minicircles. DNA topoisomerases I and II have an important role in controlling the topological state of DNA. These enzymes revert positive and negative supercoiling of double strand DNA during replication, transcription, recombination and repair. Since topoisomerases play essential roles in biological processes, they constitute a potential target for chemotherapy. In this work, we tested the effect of different topoisomerase inhibitors and DNA binding drugs in cellular proliferation and ultrastructure of epimastigote forms of *T. cruzi* and *B. culicis*, which was used as a comparative model for presenting a looser kDNA arrangement. Our results showed that eukaryote topoisomerase I inhibitors were the most active compounds with respect to *T. cruzi* cellular growth. Among them, camptothecin was the most potent inhibitor on cellular proliferation, also inducing an intense nuclear heterochromatin discompactation. In contrast, prokaryote topoisomerase II inhibitors had the kinetoplast as a main target, thus promoting ultrastructural kDNA rearrangement in *B. culicis*, but not in *T. cruzi*. However such compounds affected the cellular growth on both species, specially the former one. Considering the eukaryote topo II inhibitors, mitoxantrone was the most efficient inhibitor against *T. cruzi* proliferation. Among DNA binding drugs, berenil caused a remarkable kDNA disorganization, which was not described for any other inhibitor tested in trypanosomatids. The results obtained in this work, may help us to unravel the mechanism of action of topoisomerase inhibitors in trypanosomatids.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*; topoisomerases; inhibitors; proliferation; ultrastructure.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AS: sítios anti-podais

BSA: albumina de soro bovino

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: dimetil sulfóxido de sódio

HsIVU: protease dependente de ATP

IgG: imunoglobulina G

Kb: quilobase

kDa: quilodalton

kDNA: DNA do cinetoplasto

KFZ: zona cinetoflagelar

M: molar

MET : Microscopia Eletrônica de Transmissão

mM: milimolar ( $10^{-3}$  molar)

PBS: solução salina tamponada

pH: potencial de hidrogênio

RNAi: interferência de RNA

SFB: soro fetal bovino

SSE1: endonuclease específica de estrutura 1

TdT: desoxinucleotidil terminal transferase

Topo I: DNA topoisomerase do tipo I

Topo II: DNA topoisomerase do tipo II

UMSBP: proteínas que se ligam a seqüência universal de minicírculos

WHO: Organização Mundial de Saúde

$\mu$ l: microlitro ( $10^{-6}$  litro)

$\mu$ m: micrômetro ( $10^{-6}$  metro)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> .....	3
Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
Figura 3: Representação esquemática da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> .....	7
Figura 4: Microscopia eletrônica de transmissão do núcleo do <i>T. cruzi</i> .....	10
Figura 5: Diferentes arranjos da rede de kDNA nos tripanosomatídeos .....	11
Figura 6: Microscopia eletrônica mostrando um segmento da rede de kDNA purificada de <i>C. fasciculata</i> .....	12
Figura 7: Esquema representando a rede de kDNA de <i>C. fasciculata</i> .....	12
Figura 8: Microscopia eletrônica mostrando a zona cinetoflagelar (KFZ) .....	14
Figura 9: Modelo de replicação do kDNA .....	15
Figura 10: Modelo para segregação da rede de kDNA entre as células-filhas .....	17
Figura 11: Diferentes tipos de DNA topoisomerases encontradas em diferentes espécies .....	18
Figura 12: Superenovelamentos produzidos na dupla fita de DNA .....	19
Figura 13: Domínios da topoisomerase I humana .....	22

Figura 14: Mecanismo de ação da DNA topoisomerase tipo I .....	23
Figura 15: Comparação dos domínios de topoisomerases II em diferentes espécies .....	24
Figura 16: Mecanismo de ação da DNA topoisomerase tipo II .....	25
Figura 17: Ciclo catalítico da topoisomerase do tipo II .....	28
Figura 18: Estrutura química da camptotecina .....	30
Figura 19: Estrutura química da rebecamicina .....	32
Figura 20: Estrutura química do merbarone.....	33
Figura 21: Estrutura química do mitoxantrone .....	34
Figura 22: Estrutura química da norfloxacinina .....	35
Figura 23: Estrutura química da enoxacina .....	36
Figura 24: Esquema mostrando a ligação de um intercalante e um ligante de DNA ao DNA .....	37
Figura 25: Estrutura química do berenil .....	38
Figura 26: Estrutura química da distamicina .....	39
Figura 27: Curva de crescimento e viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> tratado com a camptotecina .....	50
Figura 28: Curvas de crescimento e de viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> com a camptotecina .....	51 e 52
Figura 29: Curva de reversibilidade da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> com a camptotecina .....	52

Figura 30: Esquema representando as mudanças morfológicas durante o ciclo celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> .....	54
Figura 31: MET de células controle de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	56
Figura 32: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com camptotecina .....	57
Figura 33: Curvas de crescimento e viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> com a rebecamicina .....	59
Figura 34: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com rebecamicina .....	60
Figura 35: Curvas de crescimento e viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> com o merbarone0 .....	62
Figura 36: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com merbarone .....	63
Figura 37: Curvas de crescimento e viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> com o mitoxantrone .....	65
Figura 38: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com mitoxantrone .....	66
Figura 39: Curvas de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> e com a <i>B. culicis</i> com a norfloxacin .....	68
Figura 40: Viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> tratado com a norfloxacin .....	69
Figura 41: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> tratados com a norfloxacin .....	70
Figura 42: Curvas de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> e com a <i>B. culicis</i> tratados com a enoxacin .....	72

Figura 43: Viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> tratado com a enoxacina .....	73
Figura 44: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> tratados com enoxacina .....	74
Figura 45: Curvas de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> e com a <i>B. culicis</i> tratados com o berenil .....	76
Figura 46: Viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> tratado com o berenil .....	77
Figura 47: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> tratados com berenil .....	78
Figura 48: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos à técnica do TdT .....	80
Figura 49: Curvas de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> e com a <i>B. culicis</i> tratados com a distamicina .....	82
Figura 50: Viabilidade celular da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> tratado com a distamicina .....	83
Figura 51: MET de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> tratados com a distamicina .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das Topoisomerases .....	21
Tabela 2: Classificação dos Inibidores de Topoisomerases .....	27
Tabela 3: Eficácia de diferentes inibidores de topoisomerases do tipo I em doenças causadas por parasitas da ordem Kinetoplastida .....	29
Tabela 4: Inibidores de topoisomerases e ligantes de DNA testados .....	85

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.2. A Ultraestrutura dos Tripanosomatídeos.....	6
1.2.1. O núcleo .....	8
1.2.2. O Cinetoplasto .....	10
1.3. As Topoisomerases .....	17
1.4. Inibidores de DNA Topoisomerases .....	26
1.4.1 Inibidores de Topoisomerase I de Eucariotos .....	28
I. Camptotecina .....	30
II. Rebecamicina .....	31
1.4.2 Inibidores de Topoisomerase II de Eucariotos .....	32
I. Merbarone .....	32
II. Mitoxantrone .....	33
1.4.3 Inibidores de Topoisomerase II de Procariotos .....	34
I. Norfloxacinina .....	35
II. Enoxacinina .....	36

1.4.4 Drogas intercalantes e ligantes de DNA .....	36
I. Berenil .....	38
II. Distamicina .....	39
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Cultivo e Manutenção dos Parasitas .....	44
3.2. Avaliação do Efeito de Inibidores na Proliferação Celular.....	44
3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
3.4. Processamento para Imunocitoquímica .....	46
3.4.1. Microscopia Óptica de Fluorescência .....	46
3.4.2. Técnica do TdT .....	47
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1. Efeito de Inibidores de Topoisomerase I de Eucarioto .....	49
I. Camptotecina .....	49
II. Rebecamicina.....	58
4.2. Inibidores de Topoisomerase II de Eucarioto .....	61
I. Merbarone .....	61
II. Mitoxantrone .....	64

4.3. Inibidores de Topoisomerase II de Procarioto .....	67
I. Norfloxacinã .....	67
II. Enoxacinã .....	71
4.4. Drogas Ligantes de DNA .....	75
I. Berenil .....	75
II. Distamicina .....	80
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é classificado no filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. O nome da ordem Kinetoplastida é derivado do cinetoplasto, uma estrutura ímpar diferente de qualquer outra encontrada na natureza onde está abrigado o DNA mitocondrial destes protozoários. A esta ordem pertencem protistas de vida livre, parasitas de insetos, plantas e vertebrados, tais como os pertencentes aos gêneros *Bodo*, *Blastocrithidia*, *Phytomonas*, *Trypanosoma* e *Leishmania*, respectivamente (Moreira *et al*, 2004). A família Trypanosomatidae é composta em sua maioria por protozoários monoxênicos, que possuem apenas um hospedeiro invertebrado e por heteroxênicos, que alternam seu ciclo de vida entre dois hospedeiros. Entre os monoxênicos estão os gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* e entre os heteroxênicos os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas*.

O gênero *Trypanosoma* inclui tripanosomatídeos que se apresentam sob a forma tripomastigota, sendo encontrados no sangue do hospedeiro vertebrado. Esta forma evolutiva possui um corpo alongado e achatado, com aproximadamente 25 µm de comprimento, que torna-se afilado principalmente na extremidade anterior, região de onde sai o flagelo livre. Nesta fase evolutiva, o cinetoplasto, estrutura que abriga o DNA mitocondrial, está localizado na região posterior do corpo celular. Já os epimastigotas, que são encontrados ao longo do trato gastrointestinal do inseto hospedeiro, são formas replicativas de corpos alongados com cerca de 20-40 µm de comprimento e com cinetoplasto localizado anteriormente em relação ao núcleo. Os amastigotas, que são encontrados no interior de células dos hospedeiros vertebrados, também são formas replicativas de formato arredondado, com flagelo reduzido e cinetoplasto anterior ao núcleo (figura 1) (Rey, 2002).

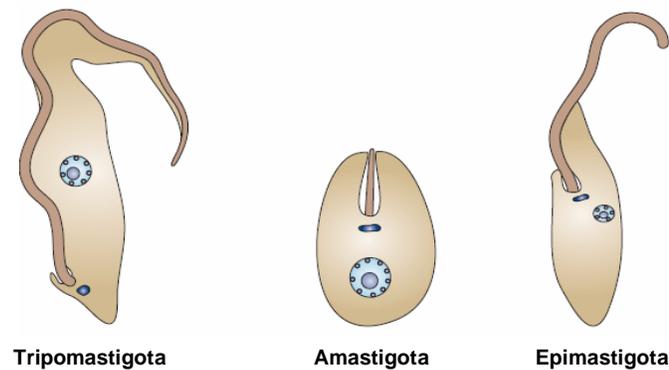


Figura 1: Formas evolutivas do *T. cruzi*, mostrando a localização do flagelo, do cinetoplasto e do núcleo em relação ao corpo celular (adaptado de Docampo *et al*, 2005).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (figura 2) exige a participação de um hospedeiro invertebrado, que pode ser um hemíptero ou reduvídeo, como o *Rhodinus prolixus*, o *Triatoma infestans* e o *Panstrongylus megistus* (conhecidos popularmente com o nome de barbeiro), e de um hospedeiro vertebrado, como o homem e outros mamíferos (tatus, gambás, tamanduás e quatis), sendo por isso conhecido como digenético ou heteroxênico (Rey, 2002; de Souza, 2002). Durante o ciclo de vida, o *T. cruzi* sofre mudanças morfológicas, ultraestruturais e bioquímicas, passando por três diferentes formas evolutivas principais, além das formas intermediárias. No intestino do inseto vetor, a forma epimastigota do *T. cruzi* se replica, se adere à superfície do intestino e se transforma em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectivas. Estes tripomastigotas metacíclicos são liberados juntamente com as fezes e urina do barbeiro durante o repasto sanguíneo do mesmo e podem penetrar através das mucosas, das conjuntivas ou de qualquer lesão presente na pele do vertebrado (figura 2a). Tal invasão do protozoário é facilitada por feridas provocadas pelo próprio hospedeiro ao coçar o local da picada (figura 2b). Conseguindo penetrar na pele, os tripomastigotas são fagocitados por macrófagos e ficam no interior do vacúolo parasitóforo, até romperem sua membrana, quando invadem o citoplasma da

célula infectada e transformam-se em amastigotas (figura 2c). Estas formas se dividem e se diferenciam em tripomastigotas, rompendo a célula hospedeira (figura 2d) e caindo na corrente sanguínea (figura 2e), de onde podem infectar novas células ou migrar para regiões mais distantes, invadindo células de outros órgãos e tecidos (figura 2f, g). Quando um barbeiro se alimenta de um mamífero infectado, ele ingere estes tripomastigotas sanguíneos (figura 2h), que se diferenciam em epimastigotas no lúmen do seu intestino (figura 2i), fechando assim, o ciclo de vida do protozoário. Esta é a principal forma de transmissão do *Trypanosoma cruzi* ao homem, embora esta também possa se dar de forma congênita, por transfusão de sangue, transplante de órgãos e por via oral, no entanto com menor frequência (Rey, 2002).

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é o fator que desencadeia o desenvolvimento da doença de Chagas. A doença foi inicialmente descrita por Carlos Chagas, em 1908, quando foram caracterizados o protozoário e seu ciclo biológico. Um ano depois, em 1909, o primeiro caso clínico da doença de Chagas foi descrito em uma menina de dois anos de idade, chamada Berenice. Na ocasião, Carlos Chagas notou que os parasitos encontrados no sangue da paciente eram os mesmos vistos no barbeiro e em outros animais examinados. Os protozoários obtidos do sangue de Berenice foram inoculados em animais de laboratório, onde a doença se desenvolveu, culminando com o aparecimento de sintomas (Chagas, 1909; Neves *et al*, 2005).

A fase aguda da doença de Chagas pode ser sintomática ou assintomática (mais frequente), dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Nesta fase há alterações degenerativas e inflamatórias devido ao grande número de parasitos em multiplicação no organismo, podendo ocorrer infecção generalizada com lesões no miocárdio, no sistema nervoso central, no fígado, no baço, nas paredes do intestino, etc. Esta fase pode vir acompanhada de edema bupalpebral unilateral, conhecido com sinal de Romaña, que em muitos casos, representa a forma mais comum de entrada dos protozoários no organismo. Já na fase crônica da Doença de

Chagas, a evolução é lenta. As alterações degenerativas e inflamatórias também ocorrem, no entanto, o número de parasitos é menor do que na fase aguda, se caracterizando por um período de latência que pode ter duração de muitos anos. As alterações que acontecem no sistema nervoso têm conseqüências que interferem no funcionamento de todo o organismo. A destruição das células ganglionares pode causar disperiostases (movimento contrátil anormal) no tubo digestivo, hipertrofia e arritmia cardíaca. Essa destruição das células ganglionares pode acontecer através da liberação de uma neurotoxina secretada pela forma amastigota, por destruição direta das células parasitadas ou por causa da inflamação provocada pela presença dos amastigotas no interior das células nervosas (Coura, 2005).

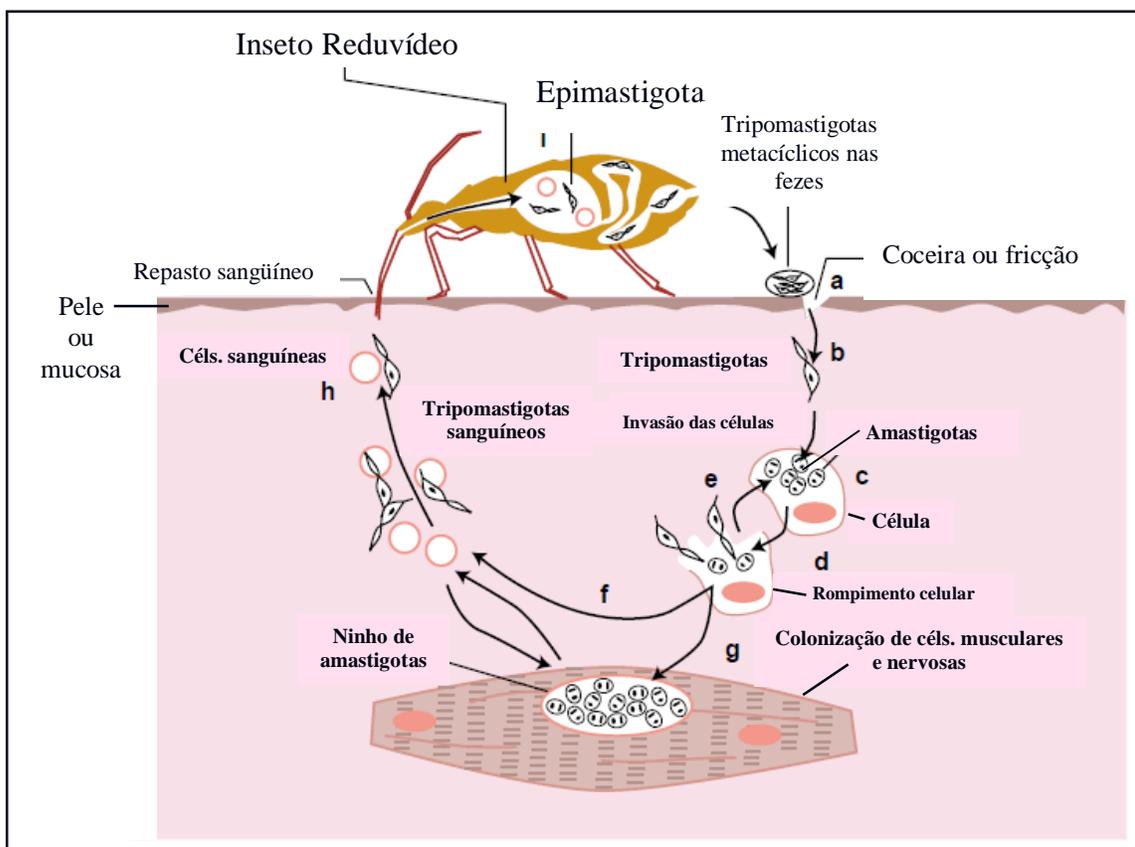


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Revisto por Macedo, Oliveira e Pena, 2002).

A doença de Chagas predomina no continente americano, onde se difunde por diversos países, desde a Argentina até o México. Ainda hoje, a doença prevalece nas habitações rurais, conhecidas como cafuas, onde os barbeiros são comumente encontrados. No entanto, isto não exclui a possibilidade de existência de casos em regiões urbanas, devido às migrações e invasão do ambiente rural pelo homem. Estima-se que haja entre 12 e 14 milhões de pessoas infectadas e 60 milhões sob risco de infecção na América Latina, região onde a doença é endêmica (WHO, 2002).

## **1.2. A ULTRAESTRUTURA DOS TRIPANOSOMATÍDEOS**

Os tripanosomatídeos possuem organelas e estruturas também presentes nas demais células eucariotas, como núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e acidocalcisomos. Entretanto, há estruturas e organelas que são características desta família, como: os reservosomos, localizados na porção posterior da forma epimastigota do *T. cruzi* e como o nome sugere, armazenam proteínas e lipídeos que desaparecem gradualmente durante o fenômeno de metaciclogênese; os glicosomos, que contêm parte da via glicolítica e outras vias metabólicas; os microtúbulos subpeliculares, localizados logo abaixo da membrana plasmática formando um citoesqueleto responsável pela rigidez e formato da célula; um flagelo único que emerge da bolsa flagelar e contém a estrutura paraflagelar, que é formada por uma série de filamentos protéicos e uma mitocôndria única e ramificada, que possui uma região alargada chamada de cinetoplasto, aonde está contido o DNA mitocondrial (figura 3) (de Souza, 2002; de Souza, 2008).

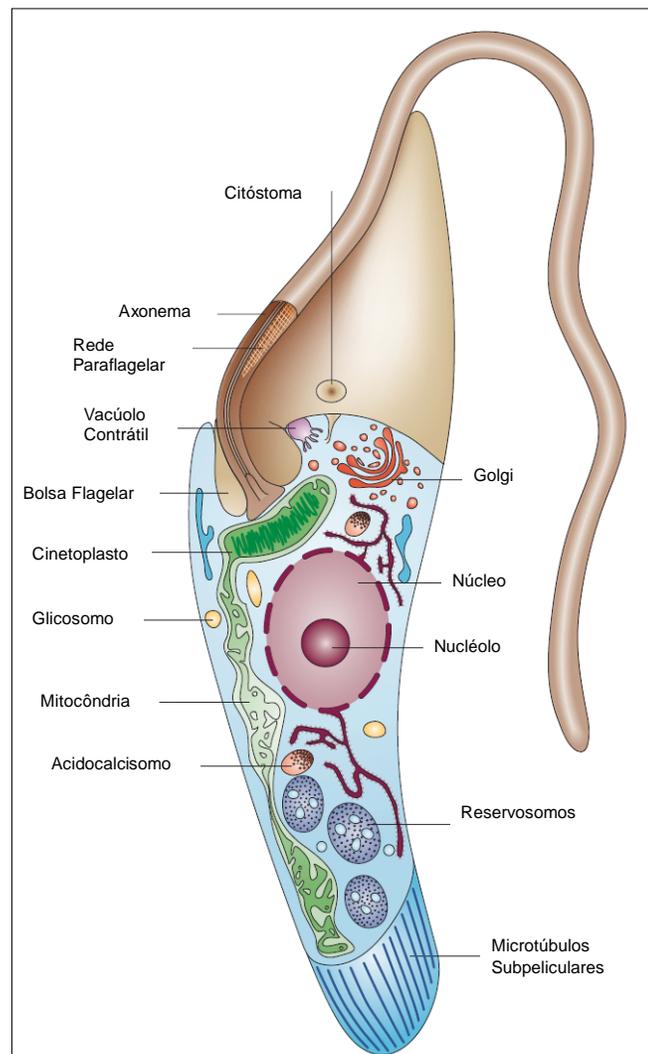


Figura 3: Representação esquemática da forma epimastigota do *T. cruzi*. Modificado a partir de um desenho de Flávia Moreira Leire, Universidade de Oxford (proposto por Docampo *et al*, 2005).

De um modo geral, encontramos na região anterior dos tripanosomatídeos o corpo basal, o flagelo, o cinetoplasto, o vacúolo contrátil e a bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo. A bolsa flagelar corresponde a uma invaginação da membrana plasmática, cuja abertura para o meio externo pode estar na extremidade anterior (como nas formas promastigota de *Herpetomonas* e coanomastigota de *Crithidia*), na lateral do corpo do parasito (como na forma epimastigota de *Blastocrithidia* e *Trypanosoma*) ou mesmo na região posterior (como na forma tripomastigota de

*Trypanosoma*). O flagelo tem origem a partir do corpo basal e é formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. A este axonema, encontra-se associado um complexo arranjo de filamentos, conhecido como estrutura paraflagelar. A estrutura paraflagelar é composta por proteínas majoritárias que são codificadas por genes cuja expressão está ligada a motilidade e adesão dos tripanosomatídeos (de Souza, 2002; Lacomble *et al*, 2008).

### **1.2.1. O NÚCLEO**

A organização do núcleo dos tripanosomatídeos se assemelha muito com a de outras células eucariotas, diferenciando-se pelo menor tamanho; pela não formação de cromossomos condensados; e pela mitose fechada, ou seja, a membrana nuclear permanece íntegra durante todas as etapas do ciclo celular. O envoltório nuclear é provido de poros que permitem a comunicação do núcleo com o citoplasma da célula e através da membrana nuclear externa, mantem uma continuidade com o retículo endoplasmático (de Souza, 2002). Na região central do núcleo se encontra o nucléolo, local da biogênese de ribossomos e dos produtos de genes ribossomais (Thiry, 1995). O nucléolo dos tripanosomatídeos possui espaços bem definidos e da mesma forma que outras células eucariotas, apresenta regiões ou compartimentos distintos: uma zona fibrilar central, que contém o DNA-r e é rodeada pela região densa fibrilar, onde o RNA ribossomal é processado e associado a proteínas para formar as subunidades ribossomais, observadas na zona granular. Deste modo, a técnica conhecida como TdT (desoxinucleotidil terminal transferase), que revela a presença do DNA, marca somente o centro fibrilar. Já a imunocitoquímica específica para RNA, mostra marcação nas zonas fibrilar e granular, além do espaço intercromatínico e dos poros nucleares. Em células mitóticas, os componentes do nucléolo

mantêm seu posicionamento central, porém não mais como uma estrutura individualizada (Motta *et al*, 2003).

No núcleo interfásico do *T. cruzi* a cromatina aparece compactada em blocos na periferia do núcleo, junto à membrana nuclear interna (figura 4-A) (Heywood & Weinman, 1978). Durante o ciclo celular, o núcleo sofre mudanças na sua organização. No início deste processo, quando o corpo basal está sendo duplicado, os primeiros sinais da divisão podem ser notados: a heterocromatina, antes encontrada junto ao envoltório nuclear, se dispersa, assim como o nucléolo, dando uma aparência mais homogênea a esta organela (de Souza, 2002; Motta *et al*, 2003). Logo após a duplicação do corpo basal, quando o cinetoplasto ainda não apresenta sinais de divisão, os microtúbulos são observados no interior do núcleo dos tripanosomatídeos formando o fuso mitótico. É possível observar o aparecimento de placas densas, que equivalem aos cinetócoros, na região equatorial do núcleo, conectando o DNA condensado aos microtúbulos. À medida que o processo de divisão celular avança, o núcleo vai se tornando mais alongado e os cinetócoros migram para os pólos opostos do núcleo (figura 4-B e C) (Solari, 1980; Ogbadoyi *et al*, 2000). O núcleo é dividido ao meio por constrição e terminada a divisão celular, a cromatina e o nucléolo se reorganizam, adquirindo o aspecto visto no núcleo interfásico onde os microtúbulos nucleares não são mais observados ao microscópio (figura 4-D) (de Souza, 2002).

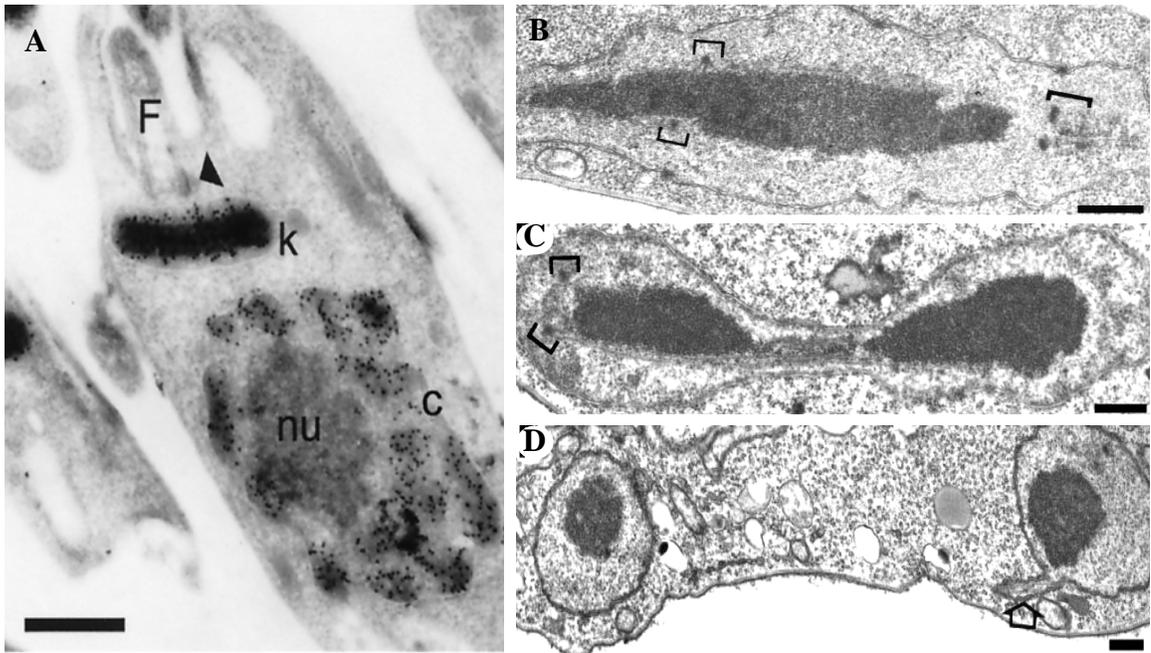


Figura 4: (A) Núcleo interfásico com intensa marcação na cromatina compactada, que é observada após o uso do TdT, uma técnica de imunocitoquímica que revela DNA de modo específico (Elias *et al*, 2002); (B-C) Alongamento do núcleo durante o ciclo celular, mostrando a migração dos cinetócoros (colchetes) para os pólos nucleares. (C) Durante a divisão nuclear, observa-se a formação de uma constrição no centro do núcleo, com posterior segregação do material genético e a aproximação dos cinetócoros dos pólos nucleares; (D) Ao final do ciclo, quando a cariocinese está quase completa, o núcleo e o nucléolo adquirem o formato arredondado. Barras = 0,5  $\mu$ m (Ogbadoyi *et al*, 1999).

### 1.2.2. O CINETOPLASTO

Os protozoários da família Trypanosomatidae apresentam uma mitocôndria única e ramificada que possui uma região alargada, conhecida como cinetoplasto, localizada perpendicularmente ao flagelo e ligada ao corpo basal através de associações protéicas (Morris *et al*, 2000; Motta, 2008). O cinetoplasto abriga o DNA mitocondrial, conhecido como kDNA, que apresenta um arranjo em rede diferente de qualquer outro encontrado na natureza.

Os tripanosomatídeos que abrigam um endossimbionte em seu citoplasma, como a *Blastocrithidia culicis* e a *Crithidia deanei*, possuem o cinetoplasto arredondado e a rede de

kDNA apresenta uma organização de aparência mais frouxa, preenchendo praticamente toda a matriz mitocondrial, de forma que sobra pouco espaço entre a rede e a membrana mitocondrial interna (figura 5-A) (Freymuller & Camargo, 1981; Cavalcanti *et al*, 2007). Nas formas epimastigota e amastigota do *Trypanosoma cruzi* o kDNA apresenta arranjo compacto e está contido em um cinetoplasto com formato de bastão (figura 5-B), enquanto que no tripomastigota, o cinetoplasto apresenta-se em formato de cesta, contendo fibrilas de DNA em um arranjo mais frouxo (figura 5-C) (revisto por de Souza, 1984).

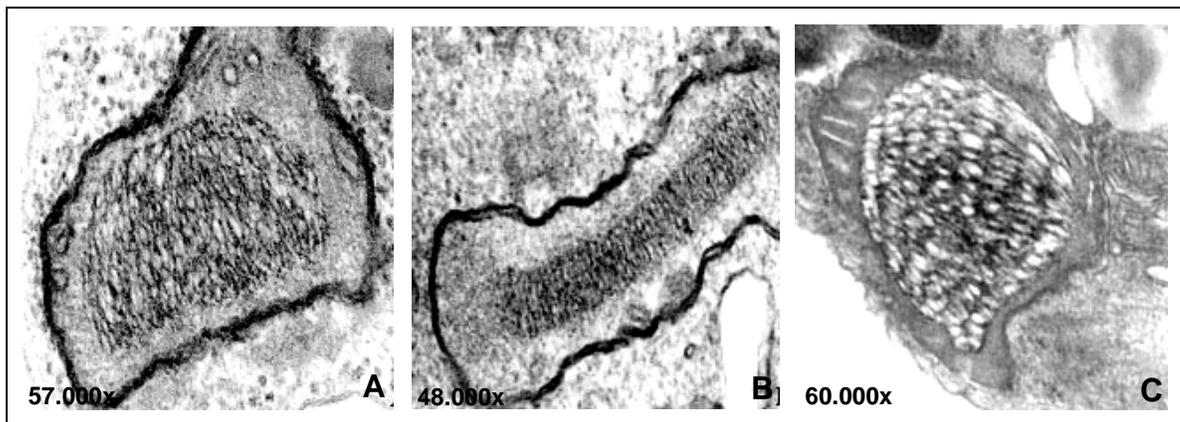


Figura 5: Diferentes arranjos da rede de kDNA nos tripanosomatídeos. (A) *B. culicis*, uma espécie com endossimbionte (B) epimastigota de *T. cruzi* e (C) tripomastigota de *T. cruzi*. Fotos A e B retiradas de Cavalcanti *et al*, 2004; foto C cedida por Juliana Dutra (Laboratório de Ultraestrutura Hertha Meyer).

A rede de kDNA é formada por centenas de moléculas circulares, os maxicírculos e minicírculos, que se encontram catenados e têm tamanho, número e seqüências diferentes (figuras 6 e 7). Os milhares de minicírculos que compõem a rede de kDNA codificam RNAs guias, os quais participam da editoração dos transcritos dos maxicírculos, tornando maduros os mRNAs que codificam proteínas mitocondriais. Os maxicírculos, por sua vez, são bem menos numerosos (algumas dezenas) e contêm genes responsáveis pela formação de RNAs ribossomais

e proteínas da cadeia respiratória (Morris *et al*, 2001; Liu *et al*, 2005). Os minicírculos têm tamanho de no máximo 10 kb, enquanto que os maxicírculos, ainda que em menor número, possuem cerca de 20 a 40 kb. Juntos, estes círculos representam aproximadamente 30% do DNA total dos tripanosomatídeos (Shapiro & Englund, 1995).

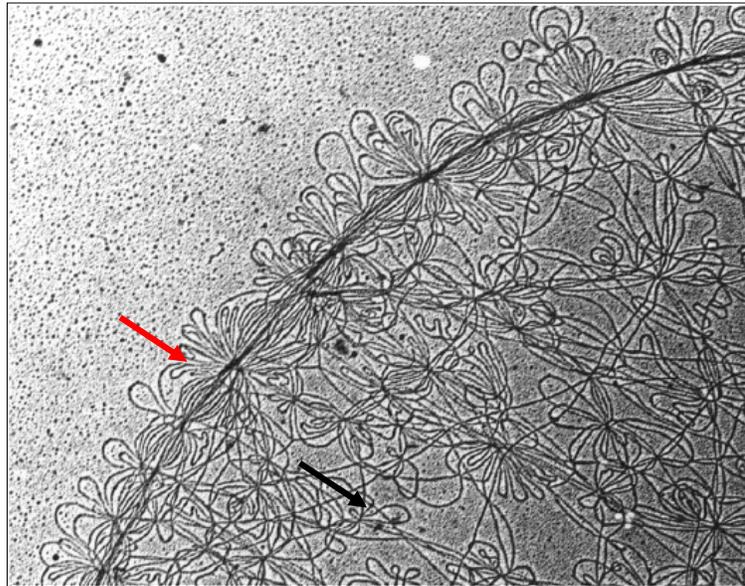


Figura 6: Microscopia eletrônica mostrando um segmento da rede de kDNA purificada de *C. fasciculata*. A seta vermelha indica os minicírculos e a seta preta os maxicírculos (Morris *et al*, 2001).

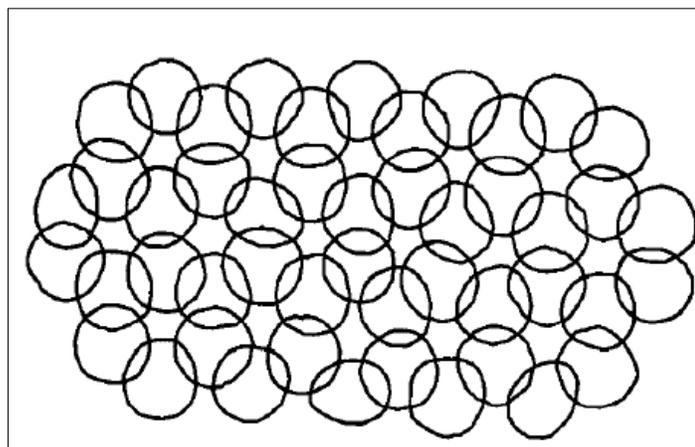


Figura 7: Esquema representando a rede de kDNA de *C. fasciculata*, no qual cada molécula está ligada a outras três vizinhas, quando a rede não está em replicação. Os círculos da periferia são os únicos que se ligam a somente outros dois vizinhos (Shapiro & Englund, 1995).

A organização do kDNA é feita por uma variedade de enzimas que se encontram distribuídas de forma característica no cinetoplasto (figuras 8 e 9). Nas extremidades da rede estão os dois sítios antipodais, nos quais se localizam enzimas como: topoisomerase do tipo II, DNA polimerase  $\beta$  e uma endonuclease específica (SSE1). Há ainda a DNA primase, que se localiza acima e abaixo da rede, caracterizando uma estrutura de sanduíche e proteínas que são exclusivas da zona cinetoflagelar (KFZ), como as ligadoras de seqüência universal de minicírculos (UMSBP) (Morris *et al*, 2001).

A replicação do DNA do cinetoplasto (kDNA) é baseada nos dois modelos biológicos melhor estudados, que são *C. fasciculata* e *T. brucei*. Diferentemente da replicação do DNA mitocondrial de células eucariotas superiores, que ocorre independente do DNA nuclear durante o ciclo celular, o kDNA se replica durante a fase S do ciclo celular e coincide em parte, com a replicação do DNA nuclear (Woodward & Gull, 1990; Elias *et al*, 2007).

Durante a duplicação do kDNA, os maxicírculos e minicírculos são duplicados para serem posteriormente distribuídos igualmente entre as células filhas (Morris *et al*, 2001; Liu *et al*, 2005). No processo de replicação dos minicírculos (figura 9), estes são liberados individualmente da rede de kDNA pela ação da topoisomerase II e chegam até o espaço entre a rede e a membrana mitocondrial voltada para o corpo basal, conhecido como zona KFZ, onde inicia-se o processo de duplicação dos minicírculos (Morris *et al*, 2001; Liu *et al*, 2005).

A replicação dos minicírculos tem início quando as USBP se ligam à seqüência universal dos minicírculos, que corresponde à origem da replicação (figura 9). Nessa etapa as primases sintetizam *primers* de RNA que servem de iniciadores para a síntese de DNA. Os minicírculos que já iniciaram a sua replicação, conhecidos como a forma intermediária em theta ( $\theta$ ), migram da zona KFZ para os sítios diametralmente opostos do cinetoplasto. A partir deste momento, os primers são removidos dos minicírculos por uma endonuclease específica (SSE1),

as lacunas entre os fragmentos de Okazaki são preenchidas pela DNA polimerase  $\beta$  e os intervalos são unidos pela DNA ligase.



Figura 8: Microscopia eletrônica mostrando a zona cinetoflagelar (KFZ), local do início da replicação e os sítios antipodais (AS). Em vermelho, a representação de um minicírculo da rede livre. KD = rede de kDNA. Barra = 250 nM (Liu *et al*, 2005).

Os minicírculos recém-sintetizados que ainda apresentam algum intervalo em sua seqüência são religados à periferia da rede de kDNA, adjacente aos sítios antipodais, através da ação da topoisomerase II. Os minicírculos contendo este intervalo, que reflete as etapas finais da replicação do kDNA, diferenciam-se daqueles que não sofreram replicação, garantindo que cada minicírculo seja replicado apenas uma vez (Morris *et al*, 2001; Liu *et al*, 2005).

Embora o mecanismo de replicação dos minicírculos seja bem estudado, pouco se conhece até o momento sobre a replicação dos maxicírculos. Sabe-se que, assim como os minicírculos, eles se replicam de forma unidirecional, formando estruturas do tipo  $\theta$ . Porém, diferentemente dos minicírculos, não se destacam da rede enquanto são replicados (Morris *et al*, 2001; Liu *et al*, 2005). Ainda não há informações sobre as enzimas participantes na replicação

dos maxicírculos. O uso de ensaios de RNAi para a RNA polimerase mitocondrial causou diminuição dos transcritos mitocondriais em comparação com os RNAs nucleares. Além disso, observou-se perda de maxicírculos sugerindo que, tal como ocorre em outros organismos, esta enzima estaria envolvida na transcrição do genoma da mitocôndria (Grams *et al*, 2002). Sabe-se que ocorre uma grande mudança na distribuição dos maxicírculos durante o ciclo celular. Nos períodos antes e no início da replicação do kDNA, os maxicírculos se distribuem aleatoriamente pela periferia da rede. À medida em que a rede se alonga durante a replicação, os maxicírculos vão se concentrando na região central. Após a replicação dos minicírculos e antes da sua segregação, os maxicírculos permanecem na região central da rede de círculos replicados. Após a divisão da rede de kDNA, os maxicírculos voltam a se distribuir pela sua periferia (Hoeijmakers & Weijers 1980; Liu *et al*, 2009).

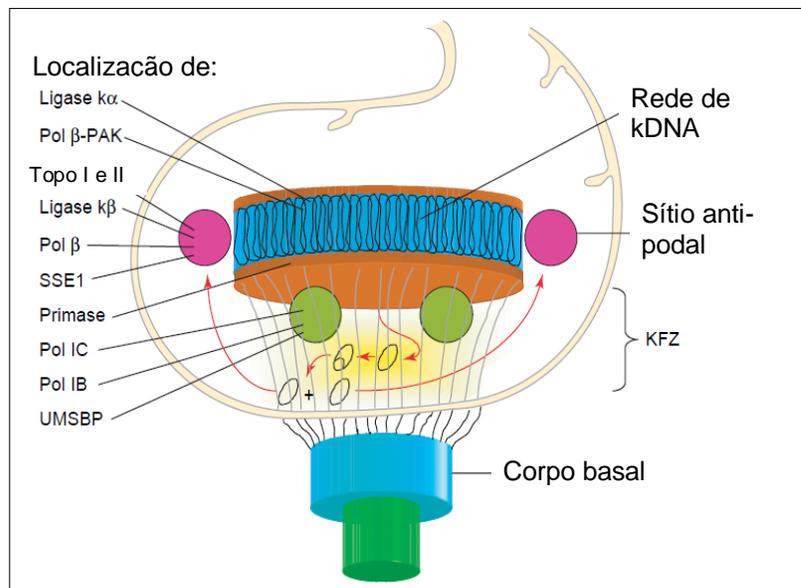


Figura 9: Modelo de replicação do kDNA baseado nos estudos de *C. fasciculata* e *T. brucei*. O esquema mostra a rede de kDNA, ao seu redor as enzimas de replicação e os minicírculos que são liberados para a zona cinetoflagelar (KFZ) (Adaptado de Liu *et al*, 2005).

A replicação dos maxicírculos é controlada por uma protease (HsIVU) semelhante às encontradas em proteassomos (Li *et al*, 2008) e por uma helicase (PIF2) (Liu *et al*, 2009). A protease HsIVU degrada reguladores, ainda não identificados, envolvidos na replicação de mini e maxicírculos, deste modo interrompendo este processo no tempo correto do ciclo celular e garantindo o tamanho apropriado da rede de kDNA. O papel da HsIVU na replicação dos maxicírculos foi demonstrado através do uso de RNAi para este enzima, o que levou a um grande aumento do número de maxicírculos e também de minicírculos (Li *et al*, 2008). A helicase PIF2 tem como função controlar o número de cópias dos maxicírculos: o uso de RNAi para esta proteína resulta na perda de maxicírculos, enquanto que a sua superexpressão levou a um aumento do número destes círculos (Liu *et al*, 2009).

Após todas estas etapas da replicação, os minicírculos e maxicírculos estão prontos para serem distribuídos igualmente entre as duas células filhas ao final do ciclo celular. Esta segregação é mediada por conexões existentes entre o corpo basal e a rede de kDNA, que constituem um complexo conhecido como TAC (do inglês Tripartite Attachment Complex), que envolve não apenas os filamentos unilaterais, como também os domínios das membranas mitocondriais. Acredita-se que o sistema TAC medeia a segregação do kDNA, pois o afastamento dos corpos basais promove a separação da rede e a sua distribuição entre as duas células-filhas (figura 10) (Liu *et al*, 2005).

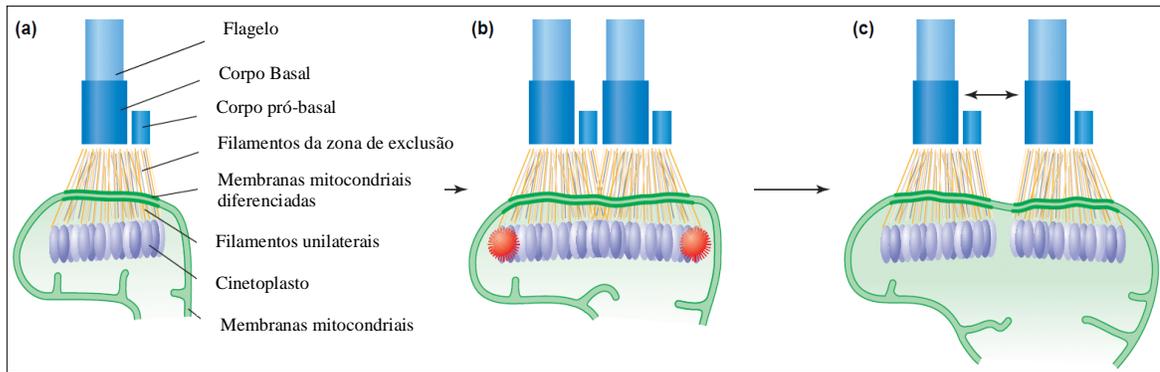


Figura 10: Modelo para segregação da rede de kDNA entre as células-filhas. O esquema mostra os filamentos que fazem a conexão entre o corpo basal e o cinetoplasto, atravessando as membranas mitocondriais diferenciadas, o que constitui o complexo Tripartite Attachment Complex (TAC) (Liu *et al*, 2005).

### 1.3. AS TOPOISOMERASES

As DNA topoisomerases são enzimas essenciais, que regulam o estado topológico do DNA na célula, estando presentes nos mais variados organismos, como vírus, bactérias, archaea, fungos, protozoários, plantas e mamíferos (figura 11) (Das *et al*, 2004).

Entre as funções das topoisomerases podemos citar a reversão de superenovelamentos positivos e negativos da dupla fita de DNA, assim como a catenação e decatenação dos círculos que compõem a rede de kDNA, durante os processos de replicação, transcrição, recombinação e reparo (Champoux, 2001; Das *et al*, 2004). A molécula de DNA comporta-se como uma estrutura fechada que não dispõe de extremidades livres, assim como as moléculas de DNA circulares. A importância destas enzimas está relacionada à estrutura de dupla hélice do DNA, uma vez que para a maioria dos processos que requerem o acesso à informação contida no DNA, há necessidade de separar ambas as fitas, ainda que temporariamente, como na transcrição ou na recombinação, ou de modo permanente, como na replicação. Este novo estado ao qual a dupla

fita é submetida gera um superenovelamento que precisa ser desfeito. É justo aí que as topoisomerases agem (figura 12) (Champoux, 2001).

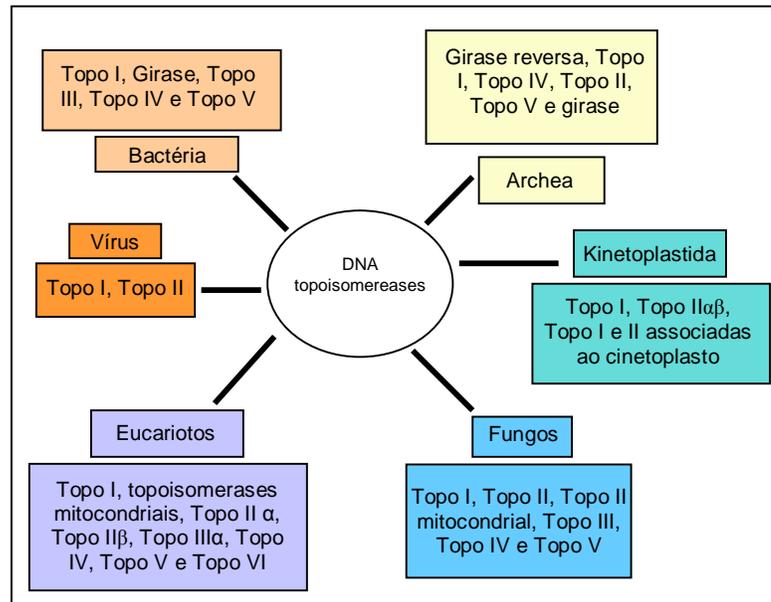


Figura 11: Diferentes tipos de DNA topoisomerases encontradas em diferentes espécies. Estas enzimas são encontradas em vírus, bactérias, plantas, tripanosomatídeos e outros eucariotos (Adaptado de Das *et al*, 2004).

Estas enzimas são classificadas em dois tipos levando em consideração seus mecanismos de ação: as DNA topoisomerases do tipo I (topo I) quebram uma das fitas de DNA, enquanto que as DNA topoisomerases do tipo II (topo II) agem clivando ambas as fitas de DNA. A clivagem do DNA pelas topoisomerases é acompanhada pela formação de uma ligação transitória entre um resíduo de tirosina da enzima e uma das extremidades da fita clivada (Lewin, 2001).

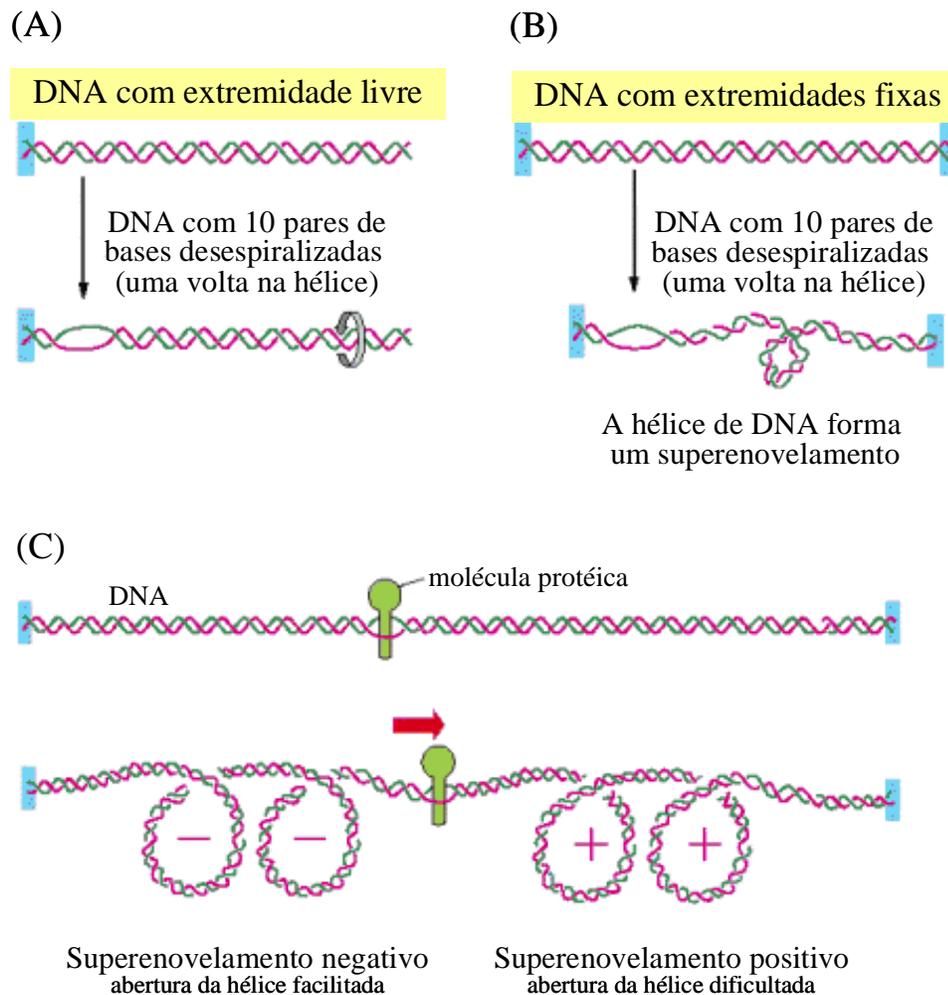


Figura 12: Superenovelamentos produzidos na dupla fita de DNA. (A) DNA com uma extremidade livre; (B) DNA com extremidades fixas mostrando o superenovelamento; (C) o movimento da proteína provoca um excesso de giros que se acumulam no DNA à sua frente e um déficit de giros atrás. Quando o enrolamento da dupla hélice no espaço se dá na mesma direção do enrolamento das duas fitas de DNA, caracteriza-se o superenovelamento positivo. O negativo se dá em sentido oposto (Adaptado de Alberts *et al*, 2004).

As topoisomerases são subdividas em famílias A e B, caracterizada pela capacidade de se ligar à extremidade 5' fosfato do DNA ou ao terminal 3' fosfato, respectivamente (tabela 1) (Champoux, 2001). O subtipo IA inclui as topoisomerases I e III de eubactérias e a topo III humana, capazes de remover apenas o superenovelamento negativo, sendo para isso necessária a

ligação com algum íon, como magnésio ou zinco (Das *et al*, 2004). As topoisomerases da família IA são codificadas por 3 genes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, segundo o projeto genoma destes protozoários (sistema Tritryp). No *Trypanosoma brucei* os transcritos de RNA são similares para os 3 genes, tanto nas formas procíclicas, quanto nas formas sanguíneas. Além disto, sabe-se que a topoisomerase IA mitocondrial encontra-se junto ao kDNA e passa por mudanças na sua distribuição ao longo do ciclo celular. Quando a expressão desta Topo I mitocondrial é silenciada por RNA de interferência, há acúmulo de círculos com estrutura intermediária em theta, indicando o papel desta enzima na replicação dos minicírculos (Scocca & Shapiro, 2008). Além disso, as enzimas pertencentes à família IA atuam nos processos de recombinação e reparo, no entanto, a sua função no metabolismo do DNA ainda não está totalmente definida (Champoux, 2001).

O subtipo IB agrupa a topo I humana capaz de reverter superenovelamentos positivos e também negativos, no entanto sem a necessidade de ligação com qualquer tipo de íon metálico para seu funcionamento (Das *et al*, 2004). As topoisomerases da família IB atuam na síntese de DNA e RNA, removendo os superenovelamentos gerados pela maquinaria de replicação (Champoux, 2001). Estas enzimas já foram purificadas de vários protozoários da ordem Kinetoplastida e são as mais bem caracterizadas dentro da família Trypanosomatidae. Elas são formadas por 2 subunidades: uma que se liga ao DNA e outra com função catalítica, como descrito em *L. donovani*. Informações a respeito destas duas subunidades distintas também estão contidas no genoma do *T. cruzi* (Bakshi & Shapiro, 2004). É interessante mencionar a perda coordenada de ambas as subunidades protéicas quando a expressão de apenas uma delas é silenciada por RNAi, sugerindo que estas só funcionam juntas. Além disso, é importante ressaltar a importância desta enzima para a sobrevivência e proliferação celular de tripanosomatídeos, assim constituindo um excelente alvo quimioterápico (Bakshi & Shapiro, 2004).

Tabela 1: Classificação das Topoisomerases (Adaptado de Champoux, 2001).

Topoisomerase	Subfamília	Subunidades	Tamanho (aa) <sup>b</sup>
Topoisomerase I de eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IA	Monomérica	865
Topoisomerase III de eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IA	Monomérica	653
Topoisomerase III de fungo ( <i>S. cerevisiae</i> )	IA	Monomérica	656
Topoisomerase III $\alpha$ de mamíferos (humana)	IA	Monomérica	1001
Topoisomerase III $\beta$ de mamíferos (humana)	IA	Monomérica	862
DNA girase reversa de archea e eubactéria ( <i>S. acidocaldarius</i> )	IA	Monomérica	1247
Girase reversa de eubactéria ( <i>M. kandleri</i> ) <sup>c</sup>	IA	Heterodimérica	A, 358. B, 1221
Topoisomerase I de eucarioto	IB	Monomérica	765
Topoisomerase de poxvírus	IB	Monomérica	314
Topoisomerase V de eubactéria ( <i>M. kandleri</i> ) <sup>d</sup>	IB	Monomérica	— <sup>e</sup>
Girase de eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IIA	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> heterotetramérica	GirA, 875. GirB, 804
Topoisomerase IV de eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IIA	C <sub>2</sub> E <sub>2</sub> heterotetramérica	ParC, 752. ParE, 630
Topoisomerase II de fungo ( <i>S. cerevisiae</i> )	IIA	Homodimérica	1428
Topoisomerase II $\alpha$ de mamíferos (humana)	IIA	Homodimérica	1531
Topoisomerase II $\beta$ de mamíferos (humana)	IIA	Homodimérica	1626
Topoisomerase IV de archea ( <i>S. shibatae</i> )	IIB	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> heterotetramérica	A, 389. B, 530

<sup>a</sup> A espécie mais estudada dentro da família está entre parênteses.

<sup>b</sup> O tamanho da subunidade corresponde ao mais estudado dentro da família.

<sup>c</sup> Incluída como a única girase reversa conhecida com estrutura heterodimérica.

<sup>d</sup> Único representante conhecido até o momento.

<sup>e</sup> Gene não clonado ainda. A proteína purificada tem peso molecular de 110kDa.

A topoisomerase I humana é a enzima melhor estudada dentro da subfamília IB e suas características se aplicam a topoisomerases I de outros eucariotos. Esta proteína de 91 kDa se

divide em quatro domínios distintos: o N-terminal que é pouco conservado e contém atividade de protease; um domínio central que é altamente conservado e que abriga resíduos catalíticos, cuja função é se ligar ao DNA; um terceiro domínio de ligação, pouco conservado e por último, o domínio C-terminal que contém um sítio ativo de tirosina (figura 13) (Champoux, 2001).

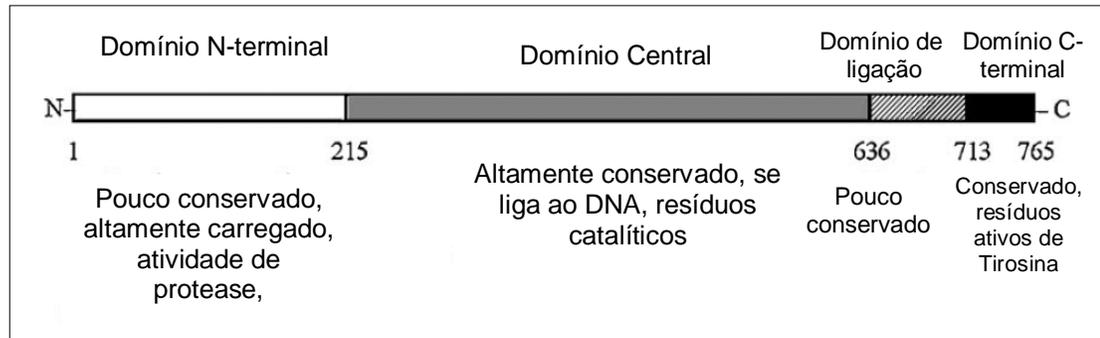


Figura 13: Domínios da topoisomerase I humana: domínio N-terminal (branco), domínio central (cinza), domínio de ligação (hachurado) e domínio C-terminal (preto) (Champoux, 2001).

O mecanismo de ação da topoisomerase do tipo I tem início quando a enzima, que possui uma tirosina no sítio ativo, se liga de forma covalente a um fosfato na fita de DNA e quebra uma ligação fosfodiéster presente numa das fitas. Desfeita esta ligação, agora as duas extremidades estão livres, podendo girar uma em relação à outra, desfazendo a tensão acumulada. A energia da ligação fosfodiéster original é preservada na ligação fosfotirosina, o que permite que a primeira se restabeleça espontaneamente, regenerando a fita de DNA e liberando a DNA topoisomerase, que ficará disponível novamente (figura 14) (Tse *et al*, 1980; Alberts *et al*, 2004).

A clivagem da dupla hélice de DNA é realizada pelas topoisomerases do tipo II. Esta classe inclui as girases bacterianas (*E. coli*), a topoisomerase IV de eubactérias e archeas, as topoisomerases II de eucariotos e as do tipo II humanas (Champoux, 2001; Das *et al*, 2004). As topoisomerases do tipo II já foram caracterizadas em vários parasitos da ordem Kinetoplastida

como: *C. fasciculata*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* e *B. saltans*. Embora os genes que codificam esta proteína sejam menores do que os descritos em outros eucariotos, eles compartilham alguns domínios funcionais e sua similaridade com os genes da topoisomerase II humana varia entre 45 e 65% (Fragoso & Goldenberg, 1990; Das *et al*, 2004). Da mesma forma que em outros eucariotos, as topoisomerases tipo II de parasitos consistem em um domínio N-terminal, que se liga ao ATP; um domínio central, que se liga ao DNA e o domínio C-terminal, que é pouco conservado (figura 15) (Das *et al*, 2006).

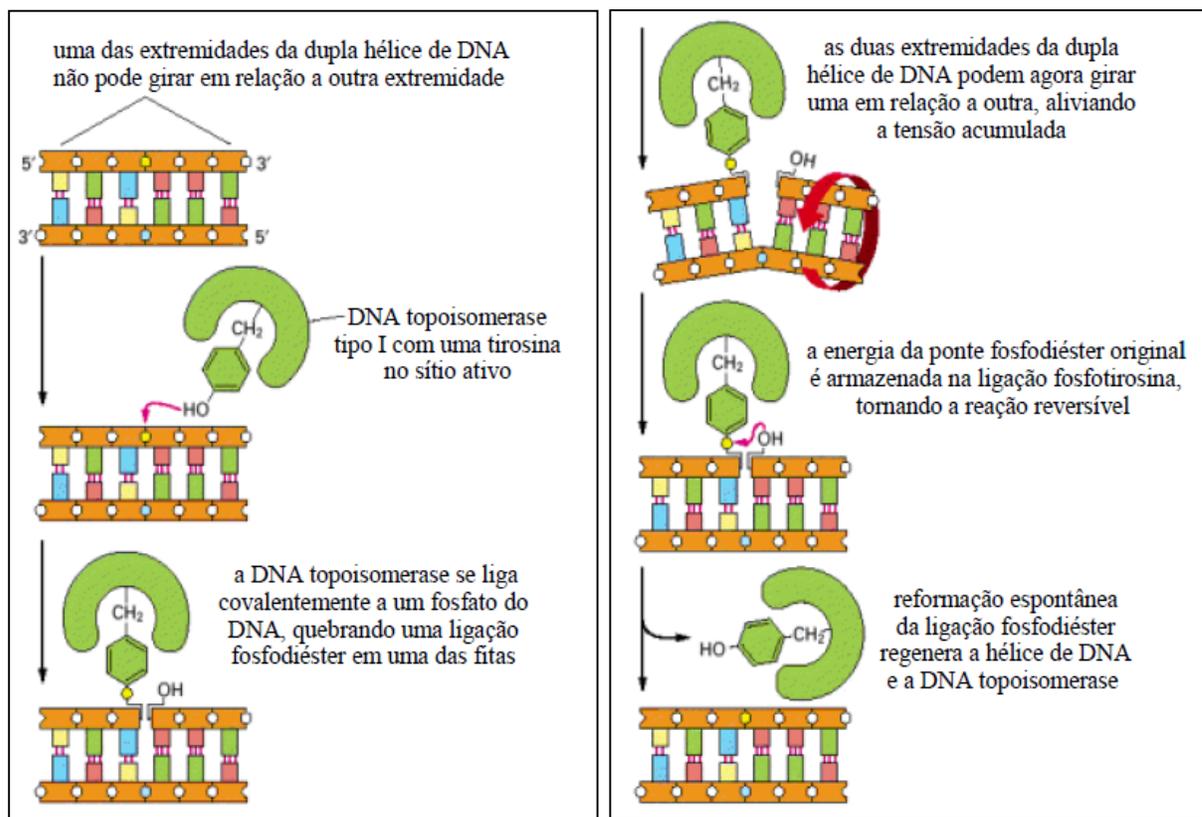


Figura 14: Mecanismo de ação da DNA topoisomerase tipo I (Adaptado de Alberts *et al*, 2004).

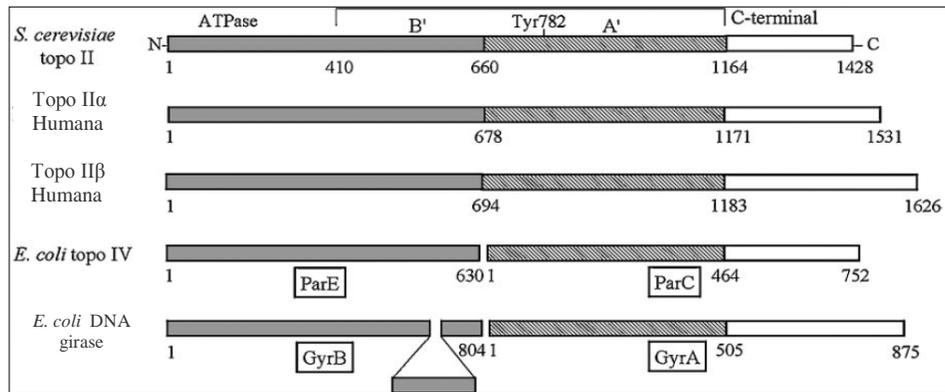


Figura 15: Comparação dos domínios de topoisomerases II em diferentes espécies: domínio N-terminal (cinza), domínio central (áreas cinza e hachurada) e domínio C-terminal (branco) (Champoux, 2001).

As topoisomerases II agem de forma parecida com as do tipo I, porém se diferenciam pelo fato de clivarem e religarem as duas fitas do DNA, e não apenas uma fita da dupla hélice. A ligação de uma topoisomerase do tipo II ao DNA é covalente e reversível, de modo que a dupla hélice fica interrompida com uma fenda, chamada de fenda protéica. Esta fenda se abre e se fecha, permitindo assim a passagem da segunda hélice de DNA. Depois que o DNA atravessa a fenda, há a reversão da ligação covalente pela topoisomerase II, restaurando uma dupla fita intacta. A enzima então é liberada e as duas duplas fitas de DNA são separadas (figura 16) (Champoux, 2001; Alberts *et al*, 2004).

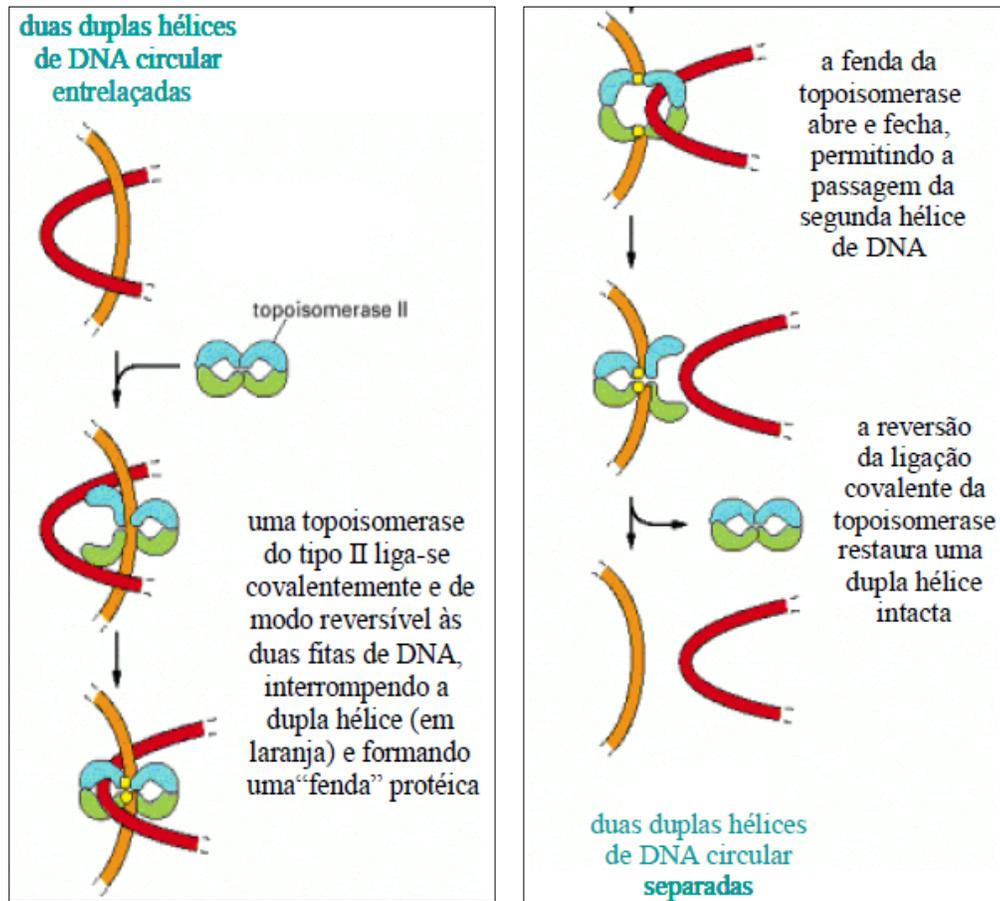


Figura 16: Mecanismo de ação da DNA topoisomerase tipo II (Adaptado de Alberts *et al*, 2004).

As topoisomerases desempenham um papel fundamental nos diversos processos celulares, tais como replicação, transcrição, reparo, recombinação e separação das cromátides irmãs durante a mitose, de modo a participar diretamente na organização do DNA. Justo por isto, estas enzimas constituem alvos de estudos quimioterápicos em células tumorais, se estendendo também para outros modelos biológicos, como os tripanosomatídeos patogênicos. Nesse sentido, uma série de inibidores para estas enzimas têm sido identificados (Champoux, 2001; Das *et al*, 2004).

#### 1.4. INIBIDORES DE DNA TOPOISOMERASES

Os inibidores de topoisomerasas representam um promissor alvo dentro da área de quimioterapia, devido ao relevante papel que estas enzimas desempenham em diversos organismos, tanto eucariotos como procariotos. Os avanços quimioterápicos têm permitido identificar e desenvolver nos últimos anos uma série de inibidores, classificados em diferentes grupos, levando em consideração seus mecanismos de ação.

Estes inibidores são divididos em duas grandes categorias: aqueles capazes de estabilizar covalentemente o complexo DNA-topoisomerase que são conhecidos como “topoisomerase poisons”, enquanto que os que interferem com a função catalítica da topoisomerase, sem estabilizar o complexo DNA-enzima, são chamados de “topoisomerase inhibitors”. Os primeiros incluem compostos como as quinolonas (que agem nas girases), a camptotecina (cujo alvo é a topoisomerase I de eucariotos), a doxorrubicina e o etoposídeo (que agem nas topoisomerasas II de eucariotos). Os inibidores abrangem as coumarinas (que agem nas girases e topoisomerasas II de eucariotos), o merbarone e a suramina (inibidores de topoisomerase II de eucarioto) (Larsen *et al*, 2003; Das *et al*, 2004). De uma forma geral, a literatura costuma denominar todas estas drogas de inibidores, não fazendo a distinção entre os tipos de droga quanto ao seu modo de ação.

Um outro tipo mais usual de classificação leva em consideração o tipo de topoisomerase alvo, assim distinguem-se os inibidores de topoisomerasas do tipo I e os inibidores de topoisomerasas do tipo II. Entre os inibidores do tipo I estão a camptotecina, a  $\beta$ -lapachona e seus derivados. Os inibidores do tipo II incluem a norfloxacina, o ácido nalidíxico, o etoposídeo, entre outros, como mostra a figura 17. Há ainda drogas que agem tanto na topoisomerase I como na II, sendo chamadas de inibidores duplos (como a intoplicina). Outros inibidores são ditos intercalantes, pois se inserem entre duas bases na molécula de DNA. Há ainda, as chamadas

drogas ligantes de DNA (como o berenil), que se ligam a uma determinada região da dupla-fita de DNA, conhecida como sulco menor, impedindo a formação do complexo DNA-enzima e interferindo assim, indiretamente na atividade das topoisomerases (tabela 2) (Das *et al*, 2004; Motta, 2008).

Tabela 2: Classificação dos inibidores de topoisomerases (Adaptado de Motta, 2008).

Classe das Drogas	Inibidores	Mecanismo de ação	Alvo
Alcalóides	Camptotecina Topotecan Irinotecan	<i>Topoisomerase poison</i>	Topo I
Bis naftoquinona	Diospirina	<i>Topoisomerase poison</i>	Topo I
Podofilotoxinas	Etoposídeo Teniposídeo	<i>Topoisomerase poison</i>	Topo II
Quinolonas	Ácido nalidíxico Ácido oxolínico	<i>Topoisomerase poison</i>	Girase bacteriana, topo IV e topo II de tripanosomatídeos
Fluoroquinolonas	Norfloxacin Ciprofloxacina Ofloxacin	<i>Topoisomerase poison</i>	Topo II
Antibióticos	Saintopina Intoplicina	Inibidores duplos	Topo I e II
Coumarinas	Novobiocina Clorobiocina Coumermicina	Inibidor de topoisomerase	Girase e topo II
Ortho-naftoquinonas	$\beta$ -lapachona e derivados	Inibidor de topoisomerase	Topo I
Acridinas	m-AMSA	<i>Topoisomerase poison</i>	Topo II
Acridinas	Acriflavina	Intercalante de DNA	Topo II
Diminazena aceturada	Berenil Distamicina	Ligante de DNA	Topo II

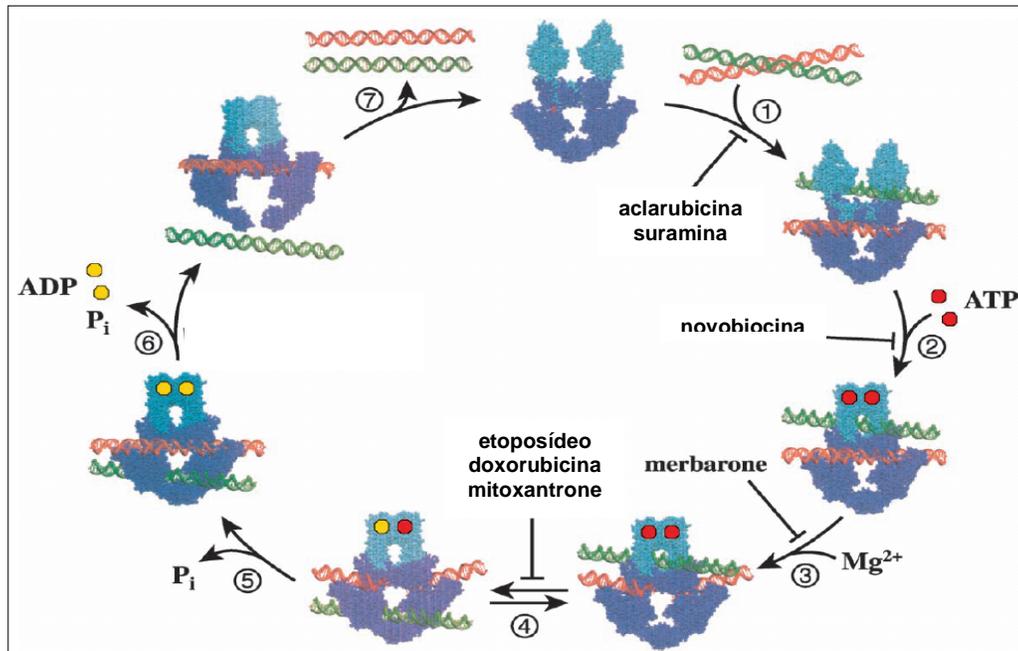


Figura 17: Ciclo catalítico da DNA topoisomerase II, mostrando em quais etapas deste ciclo agem alguns inibidores. O ciclo tem início com a ligação da enzima a fitas duplas de DNA (verde e vermelha) (1); Duas moléculas de ATP são ligadas ao complexo enzimático (2); A dupla-fita vermelha é quebrada (3) e a verde é transportada através desta quebra (4); A dupla-fita vermelha é então re-ligada (5); A dupla-fita verde é liberada através da abertura na região C-terminal da enzima, seguida pela hidrólise do ATP (6) e finalmente, o domínio N-terminal se abre liberando a dupla-fita vermelha e permitindo que a enzima se dissocie do DNA (Adaptado de Larsen *et al*, 2003).

#### 1.4.1 INIBIDORES DE TOPOISOMERASE I DE EUCARIOTOS

As topoisomerasas do tipo I de tripanosomatídeos são alvos atrativos para os estudos quimioterápicos, uma vez que apresentam diferenças estruturais em seus domínios em comparação às enzimas humanas (Das *et al*, 2004). Atualmente existem diversas drogas que têm como propriedade inibir a atividade destas enzimas, sendo que algumas delas já estão em fase de testes clínicos. Em sua maioria, estes testes se referem à ensaios com diferentes tipos de células tumorais (Bodley & Shapiro, 1994; Sen *et al*, 2004b; Balaña-Fouce *et al*, 2006), pois pouco se sabe ainda sobre seus efeitos em tripanosomatídeos, como mostra a tabela 3.

Tabela 3: Eficácia de diferentes inibidores de topoisomerases do tipo I em doenças causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida (Adaptado de Balaña-Fouce *et al*, 2006).

Classe do composto	Nome do composto	Atividade contra <sup>a</sup>		
		Tripanosomíase Africana	Doença de Chagas	Leishmanioses
Camptotecinas	Camptotecina	+++ <sup>b</sup>	++ <sup>b</sup>	++ <sup>b c</sup>
	Topotecan	+++ <sup>b</sup>	-	-
	Irinotecan	+ <sup>b</sup>	-	-
<i>Topoisomerase I poison</i> do tipo não-camptotecina	Berberina	++ <sup>b</sup>		++ <sup>b c</sup>
	Coralina	-	+ <sup>c</sup>	+ <sup>b</sup>
	DHBA	-	-	++ <sup>c</sup>
	Diospirina	-	-	++ <sup>b</sup>
	Indolocarbazoles	+++ <sup>b</sup>	-	-
	Antimoniais pentavalentes	-	-	++ <sup>b</sup>
	Ho-33342	-	-	++ <sup>b</sup>
	Pentamidinas	-	-	-
	Berenil	-	-	-
	Flavonas	-	-	++ <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Definições: (+) efeito fraco; (++) efeito moderado; (+++) efeito forte; (-) não investigados.

<sup>b</sup> Testes *in vitro*.

<sup>c</sup> Testes em modelos animais.

## I. CAMPTOTECINA

A camptotecina (figura 18) é uma molécula de origem vegetal obtida a partir da espécie *Camptotheca accuminata*, nativa da região central da China, onde é conhecida como árvore da felicidade. Este composto age como um inibidor não competitivo, ligando-se à topoisomerase I e formando um complexo estável, através de ligações covalentes, que impede a re-ligação após a quebra na dupla-fita de DNA (Balaña-Fouce *et al*, 2006). Mais especificamente, a camptotecina age sobre a topoisomerase da subfamília IB, representando um excelente inibidor deste tipo já caracterizado (Das *et al*, 2008). Dados da literatura mostram uma série de efeitos da camptotecina em culturas de células, como: inibição da síntese de DNA e RNA, bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, ativação de mecanismos de reparo do DNA, aberrações cromossômicas, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e elevação dos níveis de P53, que acabam provocando apoptose das células tratadas (Tsao *et al*, 1992; Sen *et al*, 2004a).

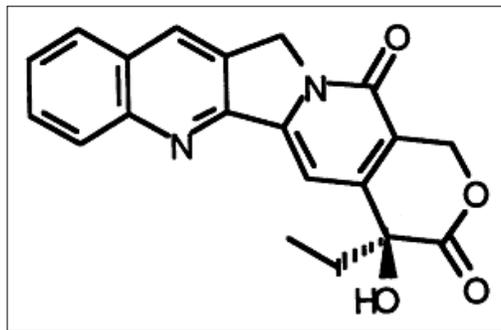


Figura 18: Estrutura química da camptotecina, um alcalóide natural de estrutura pentacíclica, cujo peso molecular é de 348,35 (Bodley & Shapiro, 1995).

Geralmente, a maioria dos relatos da literatura a respeito dos efeitos da camptotecina concentra-se em testes com células tumorais, nos quais muitos já se encontram em fase final de testes clínicos. No entanto, também há estudos, embora poucos, com tripanosomatídeos, como o

*Trypanosoma cruzi* (Bodley *et al*, 1995) e a *Leishmania donovani* (Sen *et al*, 2004b). Em 2004, Sen e colaboradores mostraram que em *Leishmania donovani*, a camptotecina inibe não só a proliferação celular, mas também o consumo de oxigênio, além de reduzir o potencial de membrana mitocondrial, alterar o funcionamento da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e levar a célula à apoptose. Além disto, alterações ultraestruturais são relatadas em *L. donovani* após tratamento com camptotecina, tais como: aumento de vacúolos e corpos lipídicos, presença de células arredondadas, perda de cromatina condensada e inchaço mitocondrial. Porém, pouco se sabe acerca dos efeitos ultraestruturais provocados por esta droga, pois os dados na literatura são escassos.

## II. REBECAMICINA

A rebecamicina (figura 19) é um composto isolado de culturas de *Saccharothrix aerocolonigenes* e pertence a uma grande classe de agentes com conhecida atividade antitumoral, os indolcarbazoles (Facompré *et al*, 2002). Sabe-se que a rebecamicina é capaz de inibir o crescimento de melanomas, adenocarcinomas e outros tipos de células tumorais através da quebra simples do DNA mediada pela topoisomerase do tipo I (Sánchez *et al*, 2006). Embora este inibidor já seja usado em células tumorais, praticamente não há relatos sobre seus efeitos em tripanosomatídeos, nem quanto às possíveis modificações ultraestruturais.

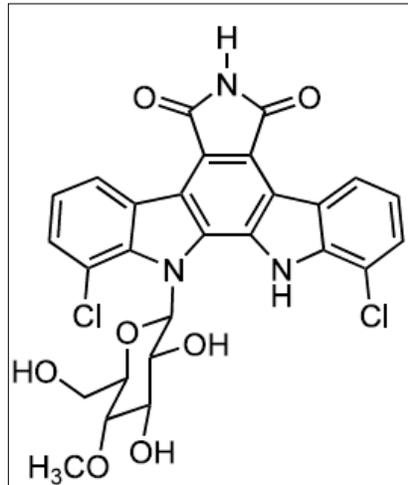


Figura 19: Estrutura química da rebecamicina, um alcalóide natural de peso molecular igual a 570,38 (Facompré *et al*, 2002).

#### 1.4.2 INIBIDORES DE TOPOISOMERASE II DE EUCARIOTOS

Esta classe de enzimas representa o principal alvo de algumas das drogas usadas com maior frequência no tratamento contra o câncer, tais como: merbarone, etoposídeo, doxorubicina e mitoxantrone (Fortune & Osheroff, 1998).

##### I. MERBARONE

O merbarone (figura 20) é uma droga que tem sido testada em células tumorais, principalmente no tratamento contra a leucemia. Entre os seus efeitos destacam-se: a formação de quebras simples na molécula de DNA, o retardo da fase S e o bloqueio do ciclo celular na fase G2 (Larsen *et al*, 2003; Otake *et al*, 2006). O que torna este composto interessante e amplamente usado é sua capacidade de provocar a quebra do complexo enzima-DNA, sem agir de modo intercalante e sem se ligar ao sulco menor do DNA. Além disso, esta droga inibe a atividade de

catenação e decatenação da topoisomerase II e induz a apoptose (Ranise *et al*, 2003). Na literatura não há descrições sobre os efeitos desta droga na proliferação e ultraestrutura dos tripanosomatídeos.

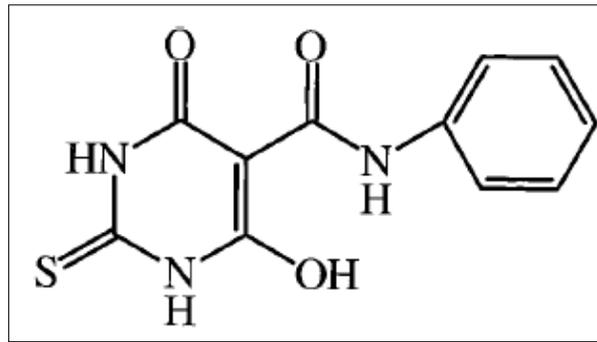


Figura 20: Estrutura química do merbarone, cujo peso molecular é de 263,27 (Fortune & Osheroff, 1998).

## II. MITOXANTRONE

O mitoxantrone (figura 21), conhecido comercialmente como Novantrone<sup>®</sup>, é um agente usado no tratamento de leucemia e outros tipos de câncer. Além do efeito em células tumorais, este composto também é eficaz contra tripomastigotas sanguíneos de *T. brucei* (Deterding *et al*, 2005). Ainda que se tenha conhecimento acerca dos efeitos do mitoxantrone neste parasito, não se sabe quais são as alterações ultraestruturais provocadas pelo mesmo (Deterding *et al*, 2005).

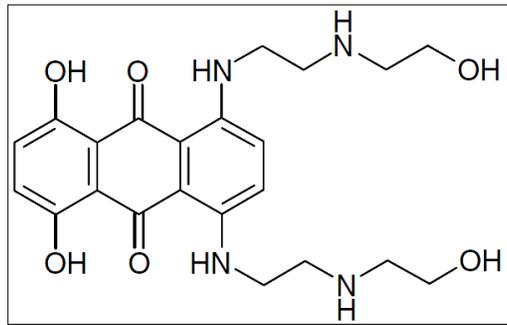


Figura 21: Estrutura química do mitoxantrone, uma antraquinona de peso molecular igual a 517,40 (Zhang *et al*, 2008).

### 1.4.3 INIBIDORES DE TOPOISOMERASE II DE PROCARIOTOS

O papel desempenhado pela topoisomerase do tipo II nos tripanosomatídeos é fundamental para a sobrevivência dos mesmos, uma vez que essa enzima participa ativamente da replicação e segregação da rede de kDNA. Além disto, as topoisomerases são importantes porque, quando inibidas, há o bloqueio da proliferação celular e o aparecimento de alterações ultraestruturais do kDNA (Gonzales-Perdomo *et al*, 1990; Cavalcanti *et al*, 2004).

Existe uma série de inibidores de topoisomerases II de procariotos que são disponíveis comercialmente, como a enoxacina, a ciprofloxacina, a norfloxacina, o ácido nalidíxico, a ofloxacina e outros (Cortázar *et al*, 2007). Devido à baixa similaridade entre a topoisomerase II bacteriana e a de eucariotos, diversos estudos têm enfatizado o potencial destes inibidores como agentes quimioterápicos promissores (Kang *et al*, 2008).

## I. NORFLOXACINA

A norfloxacin (figura 22) é classificada como uma fluoroquinolona, dentro do grande grupo das quinolonas, cujo alvo é a topoisomerase do tipo II bacteriana (girase). Este grupo inclui drogas conhecidas clinicamente e que agem como antibióticos, sendo que muitas são usadas no tratamento de infecções do trato urinário, entre elas a norfloxacin (Schaeffer, 2002). O mecanismo de ação desta droga tem como alvo a subunidade A da DNA girase e da topoisomerase IV, interferindo na re-ligação da quebra existente na dupla hélice de DNA (Hande, 1998).

Compostos da mesma classe da norfloxacin, como o ácido nalidíxico, o etoposídeo e a novobiocina se mostraram eficazes contra a proliferação de tripanosomatídeos (Cavalcanti *et al*, 2004). Além disso, sabe-se que as fluoroquinolonas têm atividade *in vitro* contra *T. brucei*. Neste caso, entre diversos compostos avaliados, a norfloxacin foi mais eficaz que a pefloxacin, fleroxacin e ofloxacin (Nenortas *et al*, 1999). As fluoroquinolonas também são conhecidas por sua atividade contra linhagens de células tumorais derivadas do sangue, do ovário e da glia (Rodriguez-Burford *et al*, 2002; Bernardi *et al*, 2006).

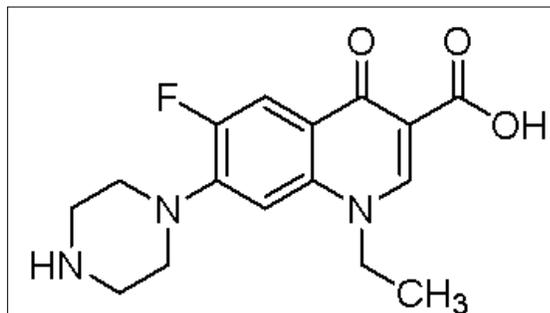


Figura 22: Estrutura química da norfloxacin, uma fluoroquinolona de peso molecular igual a 319,33 (<http://www.sigmaaldrich.com>).

## II. ENOXACINA

A enoxacina (figura 23) compartilha com as demais fluoroquinolonas mecanismos de ação similares, ainda que sejam diferentes quanto às suas propriedades farmacocinéticas e ao espectro de atividade antimicrobial, devido a diferenças nas cadeias laterais destes compostos. Muitos de seus efeitos são conhecidos em função do seu uso em infecções do trato urinário causadas por *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* (Schaeffer, 2002).

Cortázar e colaboradores demonstraram que diversas fluoroquinolonas, entre elas a enoxacina e a norfloxacin, são capazes de inibir a atividade da topoisomerase II da forma promastigota de *L. panamensis* (Cortázar *et al*, 2007). No entanto, os efeitos destes compostos a nível ultraestrutural ainda não foram explorados.

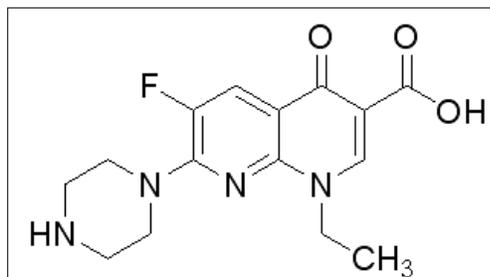


Figura 23: Estrutura química da enoxacina, uma fluoroquinolona de peso molecular igual a 320,32 (<http://www.sigmaldrich.com>).

### 1.4.4 DROGAS INTERCALANTES E LIGANTES DE DNA

As drogas ligantes de DNA são classificadas como compostos que interagem diretamente com o DNA, assim como os intercalantes (figura 24). No entanto, existem características particulares que permitem separá-los em dois grupos distintos. Os intercalantes se inserem entre

os pares de base do DNA, levando a uma redução do número de voltas e do comprimento da dupla hélice, requerem gasto de energia livre para o estabelecimento da sua inserção e são favorecidos por pontes de hidrogênio e força de van der Waals, tornando sua associação constante. Já as drogas ligantes de DNA, diferentemente dos intercalantes, não induzem grandes mudanças conformacionais no DNA, são estabilizadas por interações intermoleculares, geralmente a sua associação ao DNA é maior do que a dos intercalantes (aproximadamente  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ) e não é necessário gasto de energia livre para que ocorra a criação dos sítios de ligação (Palchaudhuri & Hergenrother, 2007).

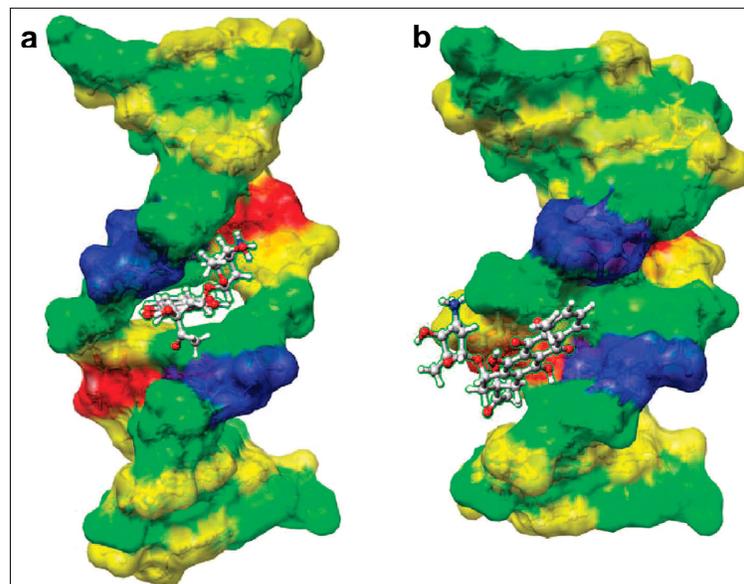


Figura 24: Esquema mostrando a ligação de um composto intercalante, como a acriflavina (a) e de um composto ligante (b), como o berenil ao DNA. Representação dos pares de base – amarelo = C; verde = G; vermelho = A; azul = T (Adaptado de Mukherjee *et al*, 2008).

## I. BERENIL

O berenil, também conhecido como diminazena aceturata, se liga ao kDNA, não de forma intercalante, mas através de interações específicas com a região do sulco menor, principalmente nos sítios ricos em pares de bases adenina-timina (A-T) (Brack *et al*, 1972; Peregrine & Mamman, 1993). Em 1990, Shapiro & Englund demonstraram que o berenil inibe a atividade da topoisomerase II mitocondrial de tripanosomatídeos. Acredita-se que ao ligar-se ao DNA, o berenil impede a formação do complexo DNA-topoisomerase, o que poderia explicar a redução da atividade desta enzima (Portugal, 1994).

A diminazena aceturata (figura 25) é comercializada com os nomes de Berenil, Azidina, Ganaseg, entre outros. Este composto tem sido utilizado para o tratamento contra *Trypanosoma* e *Babesia* spp de gado doméstico, constituindo o principal método de controle destas doenças (Peregrine & Mamman, 1993; Egbe-Nwiyi *et al*, 2005). Muitos trabalhos desenvolvidos sobre o berenil relatam seus efeitos em outros tripanosomatídeos (Egbe-Nwiyi *et al*, 2003; Egbe-Nwiyi *et al*, 2005; Witola *et al*, 2005) ou então com a rede de kDNA isolada (Brack *et al*, 1972). Porém, há poucos que discutam seus efeitos no *T. cruzi in vitro* ou que apontem as alterações ultraestruturais provocadas por essa droga em tripanosomatídeos.

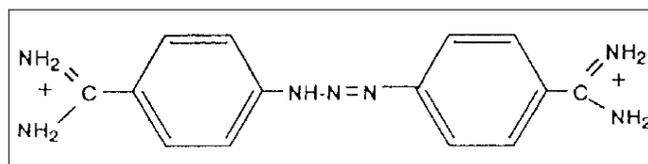


Figura 25: Estrutura química do Berenil, cujo peso molecular é igual a 515,52 (González *et al*, 1999).

## II. DISTAMICINA

Assim como o berenil, a distamicina se liga de forma não intercalante à região do sulco menor do DNA, de preferência a seqüências ricas em A-T. A afinidade desta ligação é favorecida por interações eletrostáticas com a dupla-hélice e força de van der Waals entre o composto e o sulco menor. Contudo, duas formas distintas de ligação já foram observadas: uma única molécula da droga se liga ao sulco menor, fazendo contato com apenas uma das duas fitas ou duas moléculas da droga entram em contato com o sulco menor, sendo que cada uma delas se liga somente a uma das duas fitas do DNA (Baliga & Crothers, 2000).

A distamicina (figura 26) é classificada como uma diamidina aromática, uma classe de compostos ligantes de DNA que têm atividade descrita em transcriptase reversa de vírus oncogênicos e contra infecções por *Pneumocystis carinii* em pacientes com AIDS (De Clerq & Dann, 1980; Tidwell *et al*, 1990; Stockert *et al*, 1997). No entanto, os efeitos da distamicina na proliferação e na ultraestrutura de tripanosomatídeos são ainda descritos.

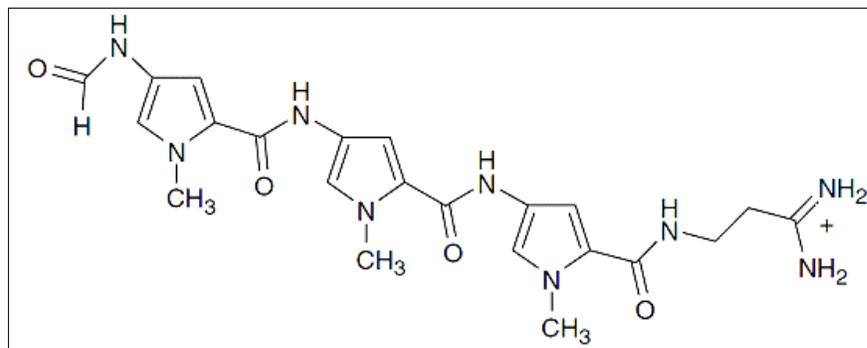


Figura 26: Estrutura química da distamicina, uma diamidina aromática de peso molecular igual a 517,97 (Zhang *et al*, 2008).

Considerando as propriedades e características de cada um dos compostos descritos anteriormente, pretendemos avaliar seus efeitos na proliferação e na ultraestrutura celular de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Deste modo, poderemos explorar a utilização destas drogas em tratamentos quimioterápicos e verificar seus efeitos na organização do DNA nuclear e na rede de kDNA deste protozoário.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivos gerais

Investigar o efeito de inibidores de topoisomerasas e drogas ligantes de DNA na forma epimastigota do *T. cruzi*.

## 2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito dos inibidores de topoisomerasas e das drogas ligantes de DNA:

a) Na forma epimastigota do *T. cruzi*, considerando:

- a proliferação e o ciclo celular;
- a ultraestrutura celular dos tripanosomatídeos;

b) Na *Blastocrithidia culicis*, que foi utilizada como modelo comparativo considerando o arranjo mais frouxo do kDNA.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS PARASITOS

Os epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* cepa Y foram mantidos em garrafas de cultura de células em meio LIT (Camargo, 1964) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e em estufa a 28°C. A *Blastocrithidia culicis* foi cultivada em garrafas de cultura de células em meio Warren (Warren, 1960) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e mantida em estufa a 28°C por 24 horas e depois estocada em geladeira.

Os repiques foram feitos duas vezes por semana para o *T. cruzi* e uma vez para a *B. culicis*, ambos contendo 10% de células, 10% de SFB e 80% de meio de cultura.

### 3.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES NA PROLIFERAÇÃO E NA VIABILIDADE CELULAR

O efeito de diferentes compostos na proliferação dos epimastigotas de *T. cruzi* e de *B. culicis*, foi avaliado por curvas de crescimento, considerando as contagens do número de parasitos vivos, tratados ou não (grupo controle) com inibidores. Estas contagens foram feitas em Câmara de Neubauer, a cada 24 horas. Os parasitos foram mantidos em tubos falcon (TPP) contendo 5 ml de volume final, utilizando um inóculo inicial de  $1,0 \times 10^6$  células. A adição da droga na cultura foi feita após 24 horas de crescimento, quando os tripanosomatídeos encontravam-se na fase exponencial de proliferação, com cerca de  $2,0 \times 10^6$  células. Os protozoários foram expostos a diferentes concentrações dos compostos, considerando os dados disponíveis na literatura. A camptotecina e a rebecamicina foram diluídas em DMSO e testadas nas respectivas concentrações: 1, 5, 10, 50  $\mu\text{M}$  (Das *et al*, 2004) e 1, 5, 10  $\mu\text{M}$  (Facompré *et al*, 2002). Neste caso, foi feito ainda o controle contendo somente o DMSO, utilizando uma

quantidade do solvente equivalente a da maior concentração de droga testada. O merbarone e o mitoxantrone, ambos diluídos em DMSO, foram testados nas respectivas concentrações: 50, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  (Fortune & Osherooff, 1998) e 5, 10, 20, 50  $\mu\text{M}$  (Deterding *et al*, 2005). A norfloxacinina e a enoxacina foram diluídas em uma solução de 100 mM de NaOH e testadas nas concentrações de 156, 470, 940, 1560  $\mu\text{M}$  (Nenortas *et al*, 1999; Cavalcanti *et al*, 2004; Cortázar *et al*, 2007). O berenil e a distamicina foram diluídos em água bidestilada obtida em aparelho Milli-Q Plus (Millipore Corporation®) e testados, respectivamente, nas concentrações de 2, 10, 20, 50  $\mu\text{M}$  (Portugal, 1994; Witola *et al*, 2005) e 5, 10, 20, 40, 100  $\mu\text{M}$  (Stockert *et al*, 1997; Zhang *et al*, 2008). A *B.culicis* foi utilizada como modelo comparativo, já que apresenta arranjo de kDNA distinto, sendo em geral mais susceptível a ação de drogas que afetam o cinetoplasto. Nesta espécie foram testados diferentes inibidores, como o berenil, a distamicina, a norfloxacinina e a enoxacina, nas mesmas concentrações citadas anteriormente.

Cada ponto da curva de crescimento foi feito em duplicata e as curvas foram repetidas 3 vezes. Para cada composto testado foi calculado o seu valor de  $\text{IC}_{50}$ , referente a 72 horas de crescimento, que representa a concentração capaz de inibir a proliferação celular em 50%. Além da curva de crescimento, foi feita a avaliação da viabilidade celular utilizando solução de azul de tripan a 0,1%. Para isto, foram retiradas alíquotas do controle e das células tratadas nas diferentes concentrações e inoculadas com o azul de tripan por 5 minutos. Após este intervalo, montou-se uma lâmina, que foi observada em microscópio óptico, que permitiu identificar as células viáveis e não viáveis.

A cura de reversibilidade foi feita do mesmo modo que as curvas de crescimento, como descrito acima. O diferencial é que neste caso, com 48 horas de crescimento, as culturas foram lavadas duas vezes em meio LIT, para a remoção da droga do meio de cultura, e em seguida mantidas novamente no mesmo volume final de 5ml.

### 3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para análise das alterações ultraestruturais causadas pelos compostos avaliados durante este trabalho, a cada 24 horas era retirada uma alíquota das culturas para o processamento de microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram inicialmente lavadas em PBS, pH 7,2 e fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, por uma hora. Em seguida, foram lavadas e então pós-fixadas em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e ósmio 1% diluídos no mesmo tampão, por 45 minutos. Terminada a etapa de pós-fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas em uma bateria de acetona em concentrações crescentes, com intervalos de 10 minutos entre cada desidratação (de 50% até 90% - uma vez e duas vezes 100%). Em seguida, o material foi infiltrado *overnight* com uma mistura 1:1 de acetona 100% e resina epóxi (Polybed). No dia seguinte, as amostras foram infiltradas em resina pura e 5 horas depois foram emblocadas. Este material permaneceu 48 horas em estufa à 60°C, até que já estivesse polimerizado. Os cortes ultrafinos foram obtidos através de ultramicrotomia em aparelho Reichert (Leica) e contrastados em acetato de uranila a 5% por 45 minutos e em citrato de chumbo por 5 minutos. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

### 3.4. PROCESSAMENTO PARA IMUNOCITOQUÍMICA

#### 3.4.1. MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA

Para estudar o efeito dos inibidores no ciclo celular do *T. cruzi*, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% diluído em PBS e permeabilizadas com detergente Triton X-100 a 1%

diluído em PBS, por 10 minutos. As células foram então aderidas a lamínulas previamente recobertas com Poli-L-lisina. Em seguida, as amostras foram incubadas em solução de bloqueio (PBS pH 8,0 contendo 3% de BSA, 0,5% de gelatina de peixe e 0,02% de Tween 20) por 30 minutos em câmara úmida. Após a etapa do bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo monoclonal específico para uma proteína flagelar de *T. cruzi* que é ligante de cálcio (Schenkman *et al*, 1991) na proporção de 1:2, por 1 hora. Após este intervalo, as amostras foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário Alexa 488 anti-mouse na proporção de 1:400, por 45 minutos. Posteriormente, foi feita incubação com DAPI (1: 500) por 6 minutos para marcar o núcleo e o cinetoplasto. Depois de lavadas e secas, as lamínulas foram montadas sobre lâminas com N-propil-galato e seladas com esmalte.

### **3.4.2. TÉCNICA DO TdT**

Com o intuito de observar a distribuição do DNA no cinetoplasto das células tratadas com o berenil, foi utilizada a técnica da desoxinucleotidil terminal transferase (TdT). O material foi preparado seguindo o protocolo de rotina para microscopia eletrônica de transmissão, porém sem passar pela etapa de pós-fixação. As grades contendo os cortes ultrafinos foram incubadas em solução contendo 20  $\mu\text{M}$  de 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), 125 U/ml de TdT e 4  $\mu\text{M}$  de cada um dos dNTPs (dCTP, dGTP e dATP). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-BrdU diluído 1:50 em PBS, lavados e incubados com o anticorpo secundário anti-camundongo IgG na proporção de 1:40 acoplado a partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro (Motta *et al*, 2003).

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Efeito de Inibidores de Topoisomerase I de Eucarioto

##### I. Camptotecina

O tratamento da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* com a camptotecina mostrou que a inibição da proliferação celular começou logo após as primeiras 48 horas de crescimento, que equivalem a 24 horas de tratamento com a droga (figura 27-A). Neste momento, já observamos um maior número de células no controle em comparação com as células tratadas. Os dados da curva de crescimento mostraram que a camptotecina apresentou um alto efeito inibitório na proliferação celular ( $IC_{50}$  2,08  $\mu$ M), sendo este dose-dependente de acordo com as concentrações da droga que foram testadas (1, 5, 10 e 50  $\mu$ M).

É possível notar que nos pontos de 72 e 96 horas de crescimento, as linhas do gráfico correspondentes às concentrações de 5, 10 e 50  $\mu$ M formam um platô, indicando que não houve proliferação da cultura, ou seja, divisão celular (figura 27-A). Por exemplo, o tratamento com 10 e 50  $\mu$ M de camptotecina, mostrou que o número de tripanosomatídeos permaneceu em torno de  $2,0 \times 10^6$  células/ml e que os protozoários estavam viáveis (figura 27-B). Este resultado sugere que a camptotecina pode interferir nos processos replicativos, assim como nos de transcrição, recombinação e reparo do DNA.

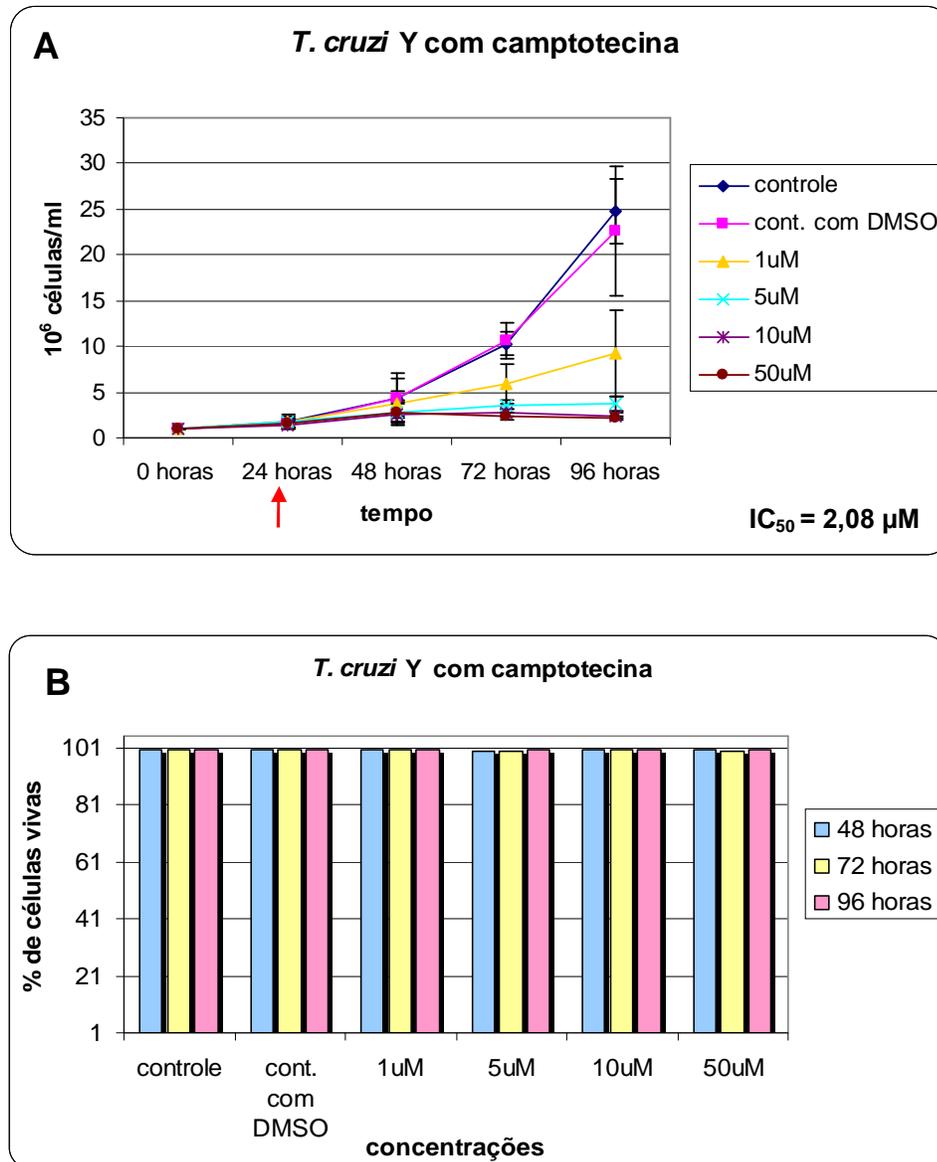


Figura 27: (A) Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com a camptotecina. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão; (B) Viabilidade celular da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com a camptotecina.

Para verificar a possibilidade das culturas tratadas voltarem a crescer após as 96 horas de tratamento com a droga foi feito outro ensaio, nas mesmas condições dos anteriores, porém neste a contagem de células foi estendida até 144 horas de crescimento. O resultado mostrou que ainda assim, o desenho do platô no gráfico se manteve, enquanto que o controle continuava em fase exponencial (figura 28-A). Neste caso, também foi feito o teste de viabilidade que mostrou que as células se mantiveram viáveis mesmo até 144 horas de crescimento. Além disto, foi feita uma curva de reversibilidade para verificar se após a retirada da camptotecina do meio de cultura, o número de células voltaria a aumentar. Neste caso, as culturas tratadas foram lavadas com meio LIT após 24 horas de tratamento e as contagens seguiram até 168 horas de crescimento. Comparando os dados obtidos a resultados anteriores, observamos que não houve crescimento das culturas tratadas, mesmo após a remoção da camptotecina, exceto quando foi utilizada a menor concentração da droga equivalente a 1  $\mu\text{M}$  (figura 29).

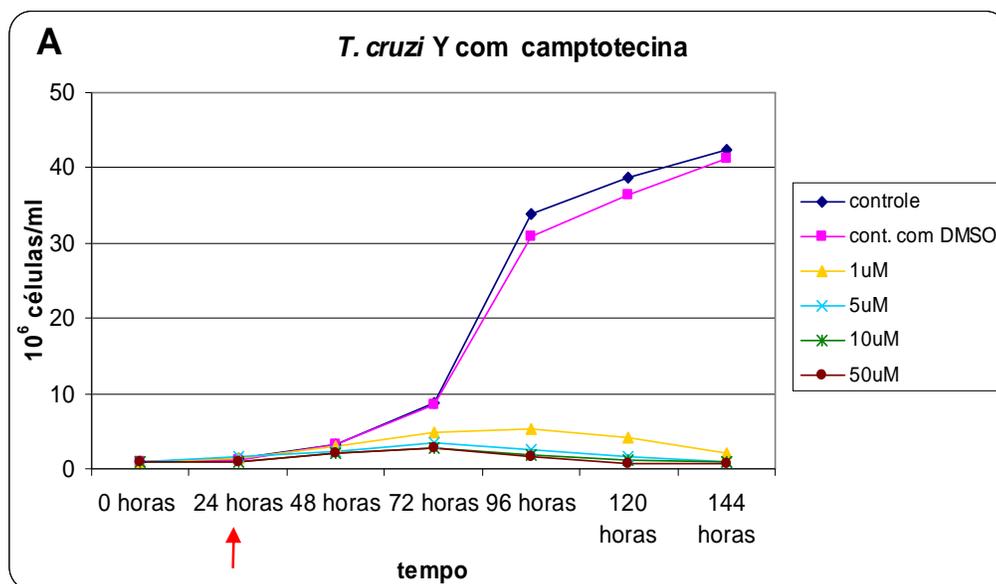


Figura 28: (A) Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* em tempo prolongado na presença da camptotecina. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha).

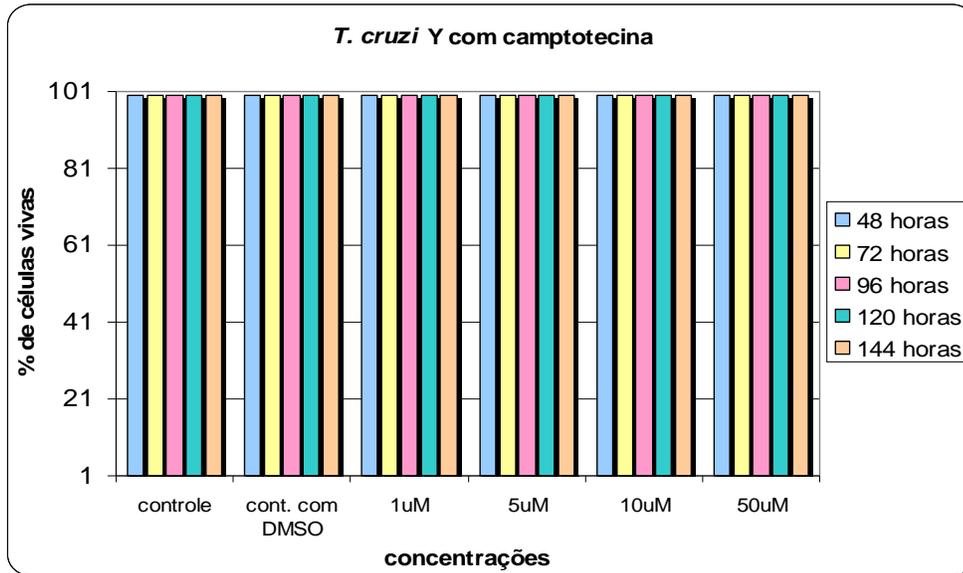


Figura 28: (B) Viabilidade celular da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com a camptotecina até 144 horas de crescimento.

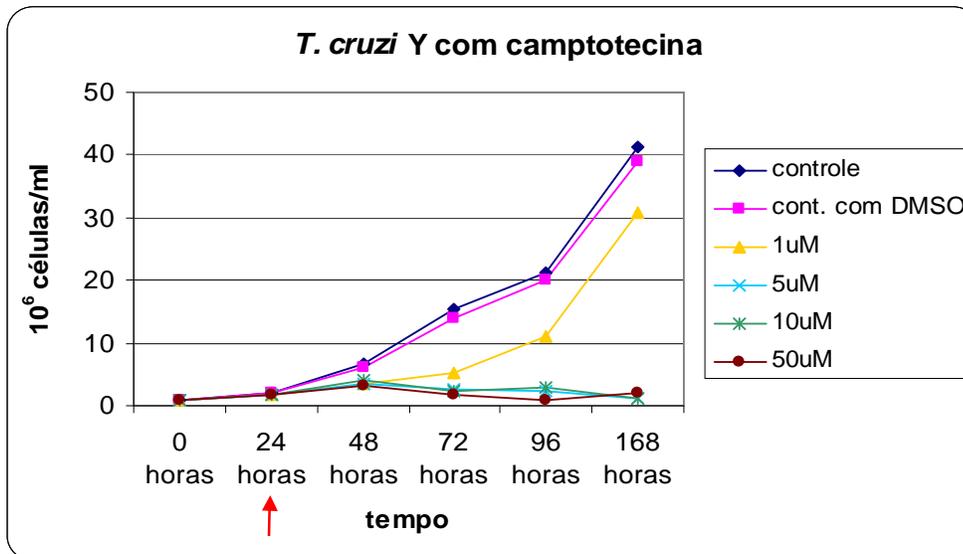


Figura 29: Curva de reversibilidade da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com a camptotecina. A droga foi acrescentada com 24 horas de crescimento (seta vermelha) e após 48 horas de crescimento, as culturas foram lavadas para remoção da droga do meio.

Nas curvas de crescimento, nota-se sempre a presença de um platô, indicando que as células estão sofrendo uma alteração dos seus processos de replicação em função do tratamento com a camptotecina. Para saber se houve interrupção do ciclo celular, os parasitos tratados com a droga foram observados por microscopia óptica de fluorescência, após incubação com DAPI, que revela núcleo e cinetoplasto, e com anticorpo anti-flagelo. Em seguida, foi feita a quantificação dos protozoários, levando em consideração os diferentes padrões morfológicos adquiridos pela forma epimastigota do *T. cruzi* ao longo do ciclo celular, como já bem descrito (Elias *et al*, 2007-figura 30-A). As contagens indicaram um grande número de células tratadas apresentando dois flagelos, dois corpos basais, um cinetoplasto e um núcleo, o que as caracteriza na fase G2. Já as células controle apresentavam, em sua maioria, parasitos com um flagelo, um corpo basal, um cinetoplasto e um núcleo - características que permitem reconhecer que os protozoários estão na fase G1/S do ciclo celular (figura 30-B, C).

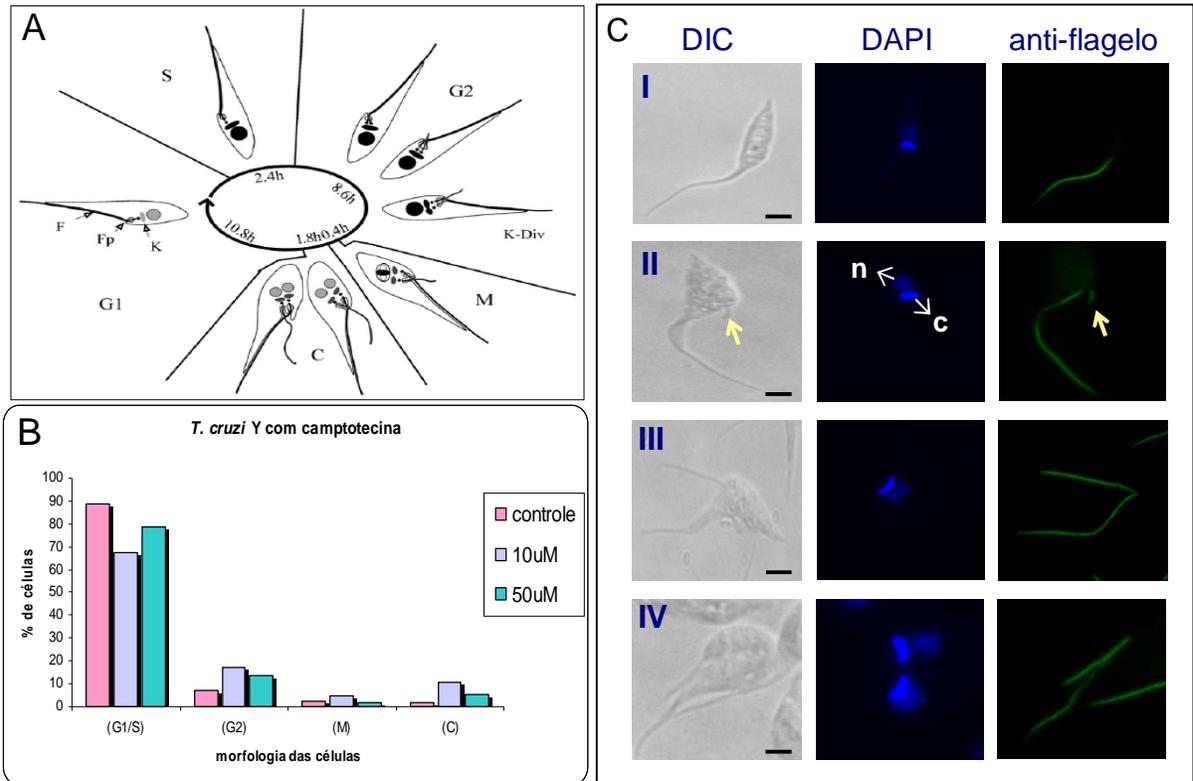


Figura 30: Em (A), esquema das mudanças morfológicas da forma epimastigota do *T. cruzi* durante o ciclo celular. As fases são identificadas por G1, S (síntese), G2, M (mitose) e CI (citocinese). Em G1, as células são identificadas pela presença de 1 núcleo, 1 cinetoplasto e 1 flagelo. Na fase S ocorre a duplicação do DNA do núcleo e do cinetoplasto, porém todas as organelas ainda são de cópia única. Em G2, o novo flagelo começa a emergir da bolsa flagelar e o cinetoplasto se segrega. Na mitose ocorre divisão do material genético do núcleo e na citocinese, divisão das duas células-filhas (Elias *et al*, 2007). Em (B), contagem dos padrões celulares considerando o número de núcleos (N), cinetoplastos (C) e flagelos (F) após 48h de tratamento com a camptotecina. Nota-se que houve um aumento do número de células em G2 após tratamento com a droga. Em (C), imagens de imunofluorescência mostrando os padrões do ciclo celular do *T. cruzi*, onde: I corresponde ao padrão de G1 (1F1C1N); II corresponde à fase G2 (2F1C1N). Setas amarelas apontam o novo flagelo; III corresponde à mitose (2F2C1N) e IV à citocinese (2F2C2N). Barras = 3  $\mu$ m.

Tendo conhecimento do efeito da camptotecina na proliferação e no ciclo celular do *T. cruzi*, em uma etapa seguinte partimos para a observação das possíveis alterações ultraestruturais causadas por este composto através de análise por microscopia eletrônica de transmissão. Para isto, as características ultraestruturais das células tratadas com diferentes concentrações da droga foram comparadas com aquelas de uma célula controle (figura 31). O tratamento dos parasitos com a camptotecina levou a uma intensa descompactação da heterocromatina nuclear (figura 32), que na célula controle aparece de maneira bem característica ao redor do nucléolo e junto do envoltório nuclear (figura 31). Tal alteração foi observada logo nas primeiras 24 horas de tratamento com a droga na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . O mesmo resultado foi obtido em concentrações menores, como 5  $\mu\text{M}$  após 48 horas e 10  $\mu\text{M}$  por 72 horas de tratamento (figura 32). Esta descompactação da heterocromatina periférica permitiu a visualização de estruturas eletrondensas no interior do núcleo, não vistas no controle. Tais pontos eletrondensos podem representar os corpúsculos de Cajal, regiões nucleares onde ocorrem a formação e maturação das ribonucleoproteínas que formam os spliceossomos, que estão envolvidos no processamento do RNA-m (splicing). Além da descompactação da heterocromatina nuclear, houve também inchaço mitocondrial, porém sem interferência na organização da rede de kDNA (figura 32).

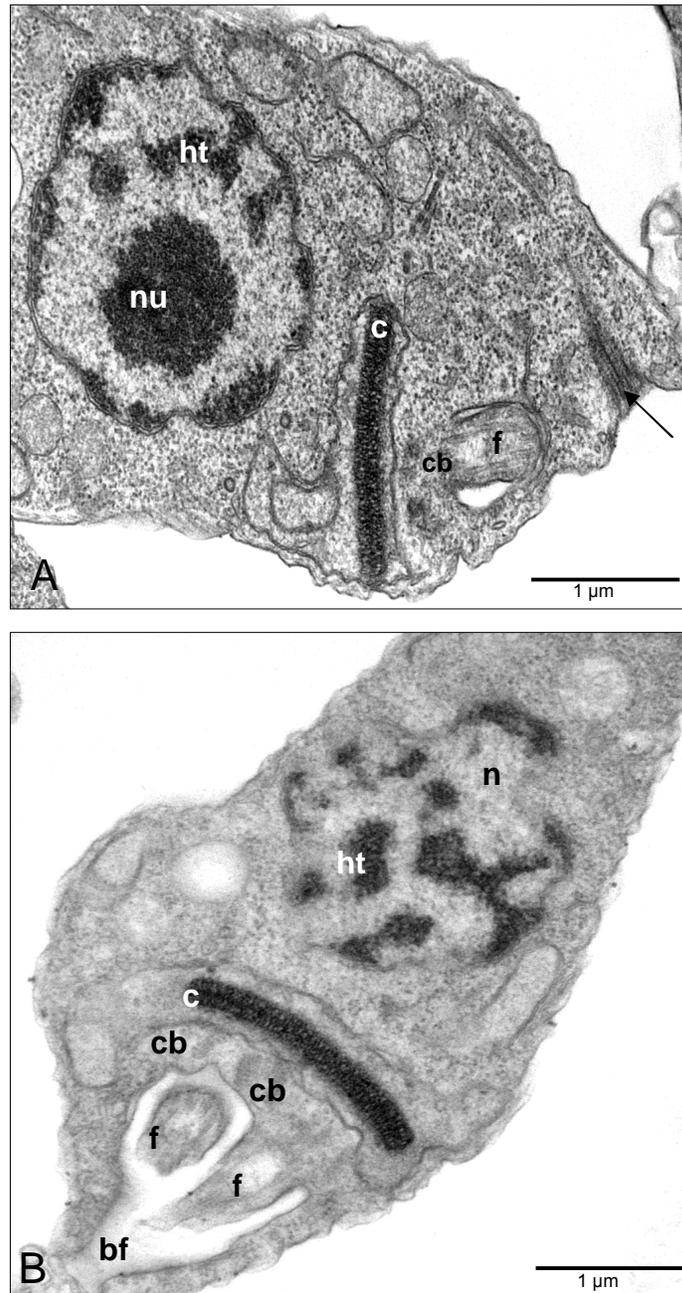


Figura 31: Células controle de epimastigotas de *T. cruzi*. Em (A) é possível ver o núcleo, nucléolo (nu) e a heterocromatina (ht) localizada junto ao envoltório nuclear. Notar a presença de um único cinetoplasto (c), corpo basal (cb) e flagelo (f), o que caracteriza células na fase G1/S. A seta indica a saída do citóstoma; Em (B) é possível ver o núcleo (n), a heterocromatina compactada em blocos distribuída pelo núcleo (ht), o cinetoplasto arqueado (c) em formato de bastão, dois corpos basais (cb), dois flagelos (f), e ainda a bolsa flagelar única (bf), caracterizando uma célula na fase G2.

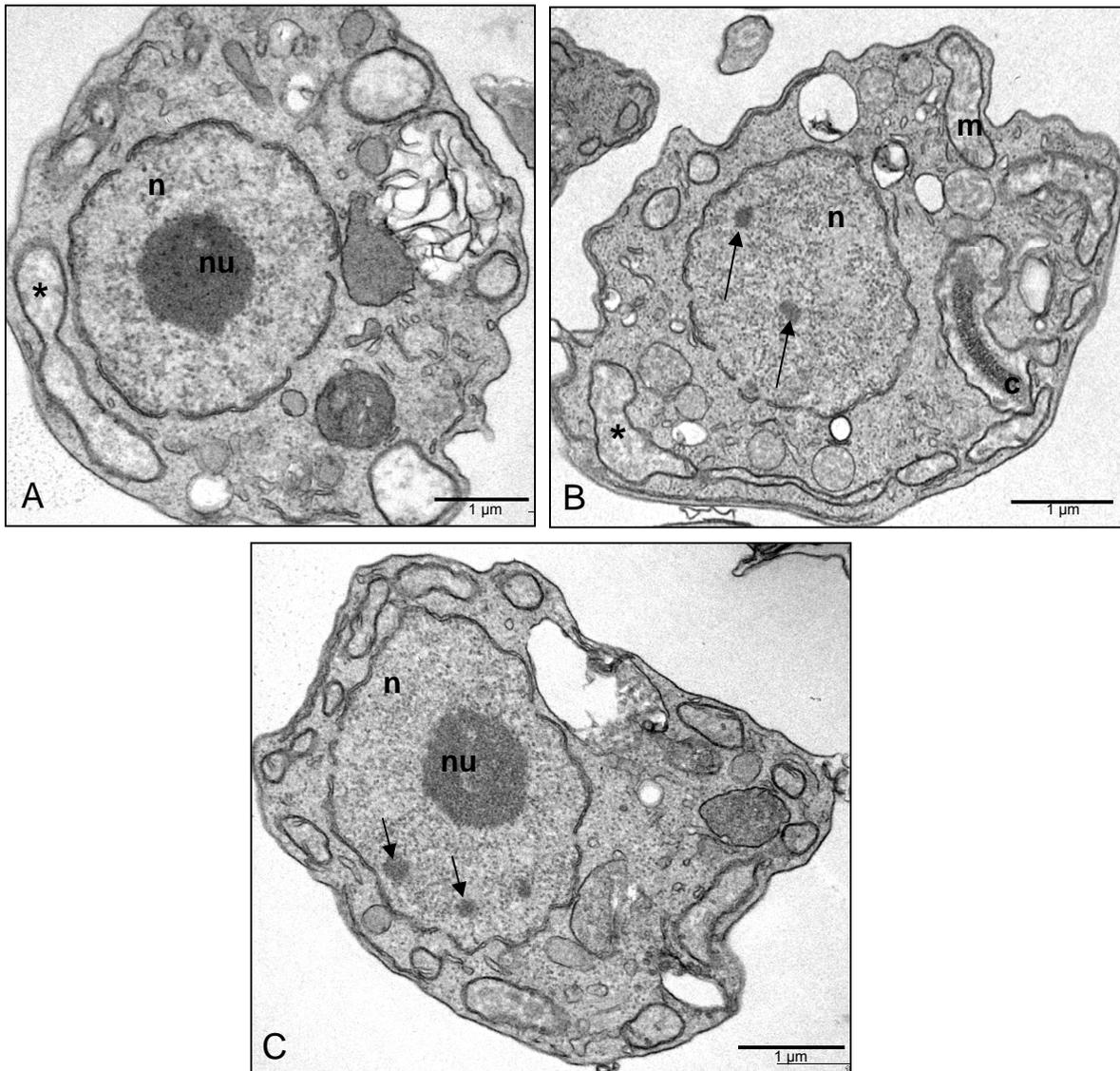


Figura 32: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com camptotecina. Em (A), células tratadas com 50  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Nota-se a descompactação da heterocromatina nuclear ao redor do nucléolo (nu) e o inchaço mitocondrial já no início do tratamento (asterisco); Em (B), 10  $\mu\text{M}$  por 48 horas, mostrando o desaparecimento da heterocromatina e o surgimento de estruturas eletrondensas (setas). Notar também, o inchaço mitocondrial (asterisco); Em (C), ainda 10  $\mu\text{M}$  por 48 horas, onde observa-se o nucléolo (nu) sem cromatina perinucleolar juntamente com as estruturas eletrondensas que podem equivaler aos corpúsculos de Cajal (setas).

## II. Rebecamicina

O tratamento com a rebecamicina causou redução do número de parasitos logo nas primeiras 24 horas de tratamento com 10  $\mu\text{M}$  e com 48 horas na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (figura 33-A). De modo semelhante ao observado para a camptotecina, a curva de crescimento referente à rebecamicina mostrou um platô após o uso da maior concentração da droga (10  $\mu\text{M}$ ), indicando que houve uma interrupção no ciclo celular, como descrito anteriormente. De outro modo, a concentração de 1  $\mu\text{M}$  não causou um efeito significativo, uma vez que o número de parasitos neste caso foi muito similar ao do controle (figura 33-A), diferentemente do efeito causado pela camptotecina, onde houve uma significativa queda na quantidade de parasitos após tratamento com esta mesma concentração da droga (figura 27-A). A rebecamicina, assim como a camptotecina, também apresentou alto efeito inibitório na proliferação das formas epimastigotas do *T. cruzi* e um valor de  $\text{IC}_{50}$  igual a 6,04  $\mu\text{M}$ . Importante mencionar que a viabilidade celular dos parasitos não se mostrou afetada após o tratamento com este inibidor (figura 33-B).

Ao nível ultraestrutural, a rebecamicina provocou o inchaço mitocondrial das células após tratamento com 5  $\mu\text{M}$  por 48 horas, entretanto a ultraestrutura do kDNA não se apresentou alterada. Após o crescimento dos protozoários na presença de 10  $\mu\text{M}$  de rebecamicina pelo mesmo intervalo de tempo, foi possível notar que as células apresentavam o desaparecimento da heterocromatina (figura 34), da mesma forma que foi relatado com as células tratadas com a camptotecina (figura 32).

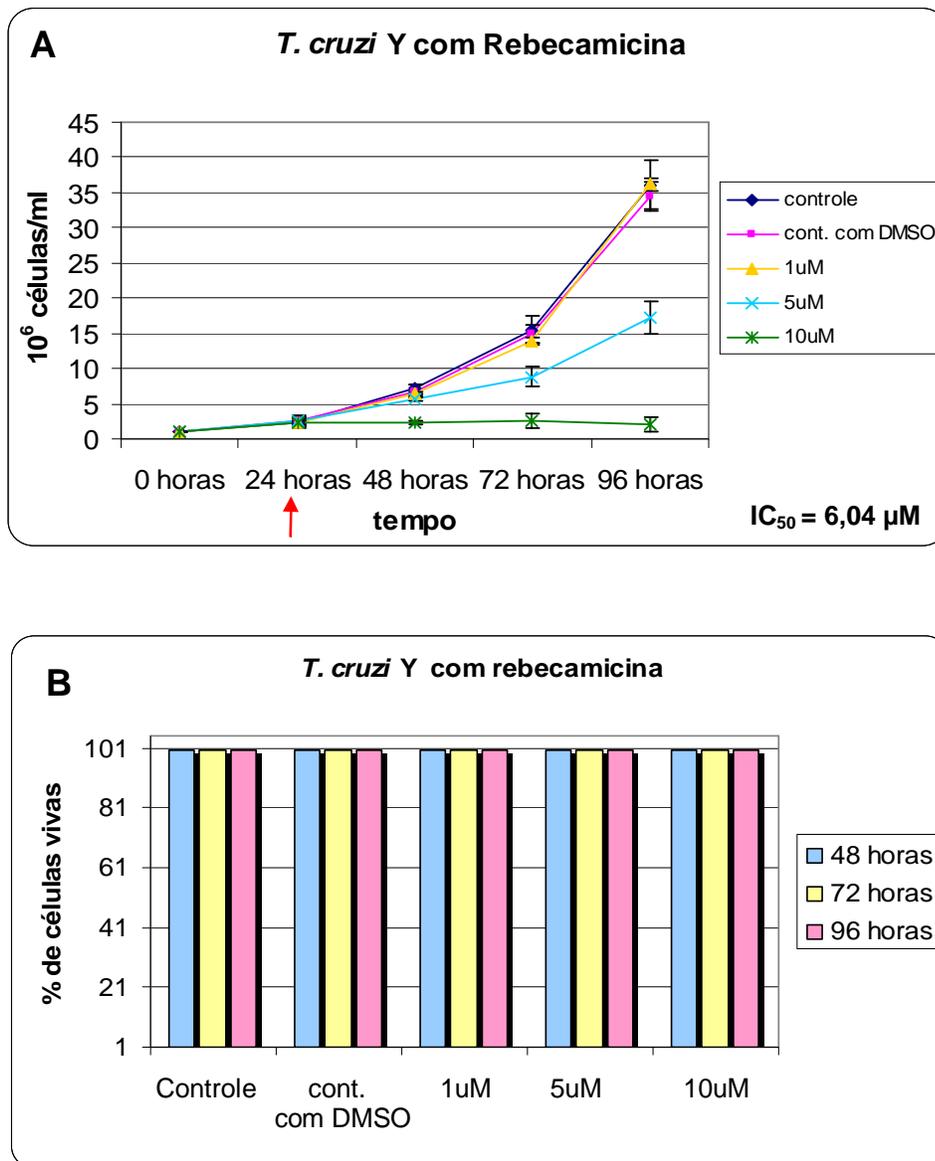


Figura 33: (A) Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* tratado com a rebecamicina. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão; (B) Viabilidade celular dos epimastigotas de *T. cruzi* tratados com a rebecamicina.

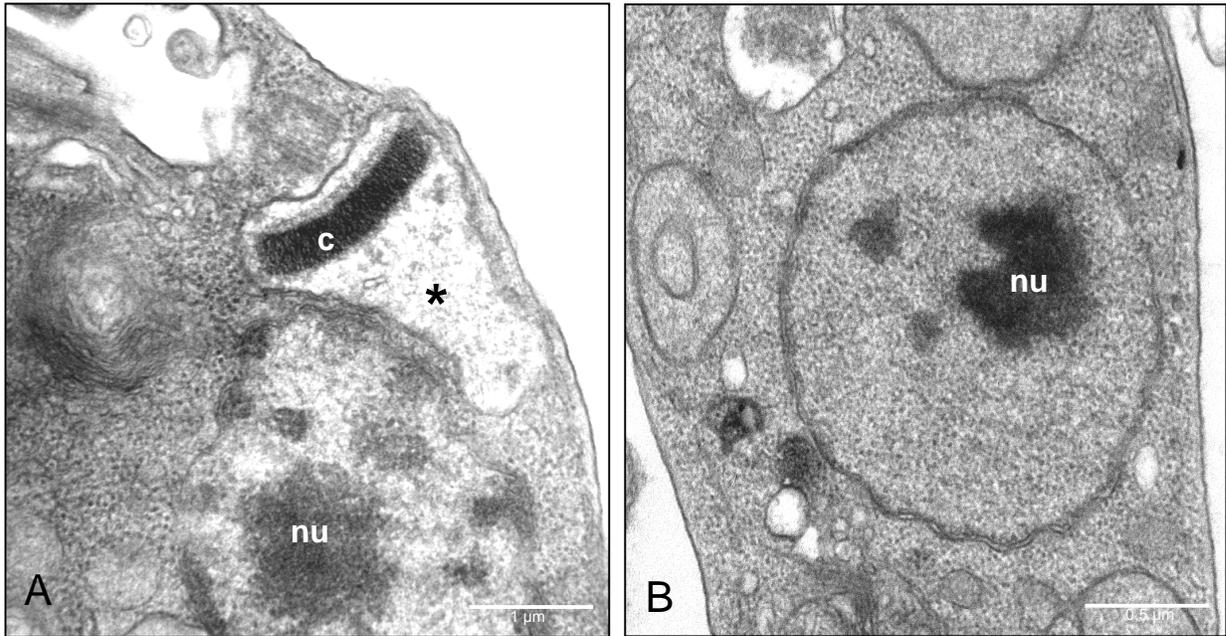


Figura 34: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com rebecamicina. Em (A), células tratadas com 5  $\mu\text{M}$  por 48 horas, mostrando o inchaço mitocondrial (asterisco), entretanto o arranjo do kDNA não é alterado. Em (B), células tratadas com 10  $\mu\text{M}$  por 48 horas, onde nota-se o desaparecimento da heterocromatina condensada na matriz nuclear e ao redor do nucléolo (nu).

## 4.2. Inibidores de Topoisomerase II de Eucarioto

### I. Merbarone

O merbarone foi testado em concentrações bem maiores do que as utilizadas para inibidores de topoisomerase I de células eucarióticas. Inicialmente, o tratamento foi feito com concentrações abaixo de 100  $\mu\text{M}$ , que praticamente não surtiram efeito, o que nos levou a testar concentrações maiores nas curvas seguintes. Como é possível ver na figura 35-A, houve dose-dependência no tratamento com a droga, entretanto a concentração mais alta utilizada (300  $\mu\text{M}$ ), manteve 50% das células ainda em crescimento. De todos os compostos testados, este foi o que mostrou menor efeito na proliferação celular dos epimastigotas, apresentando o maior valor de  $\text{IC}_{50}$  (338,17  $\mu\text{M}$ ). Quanto à viabilidade celular, também não houve alteração provocada pelo merbarone em 100% das células tratadas (figura 35-B).

Ao nível ultraestrutural, o merbarone não provocou grandes alterações dos parasitos tratados, com exceção de inchaço mitocondrial. Mesmo após o tratamento com 300  $\mu\text{M}$  da droga, que foi a maior concentração testada, não foram observadas descompactação do kDNA ou da heterocromatina nuclear (figura 36).

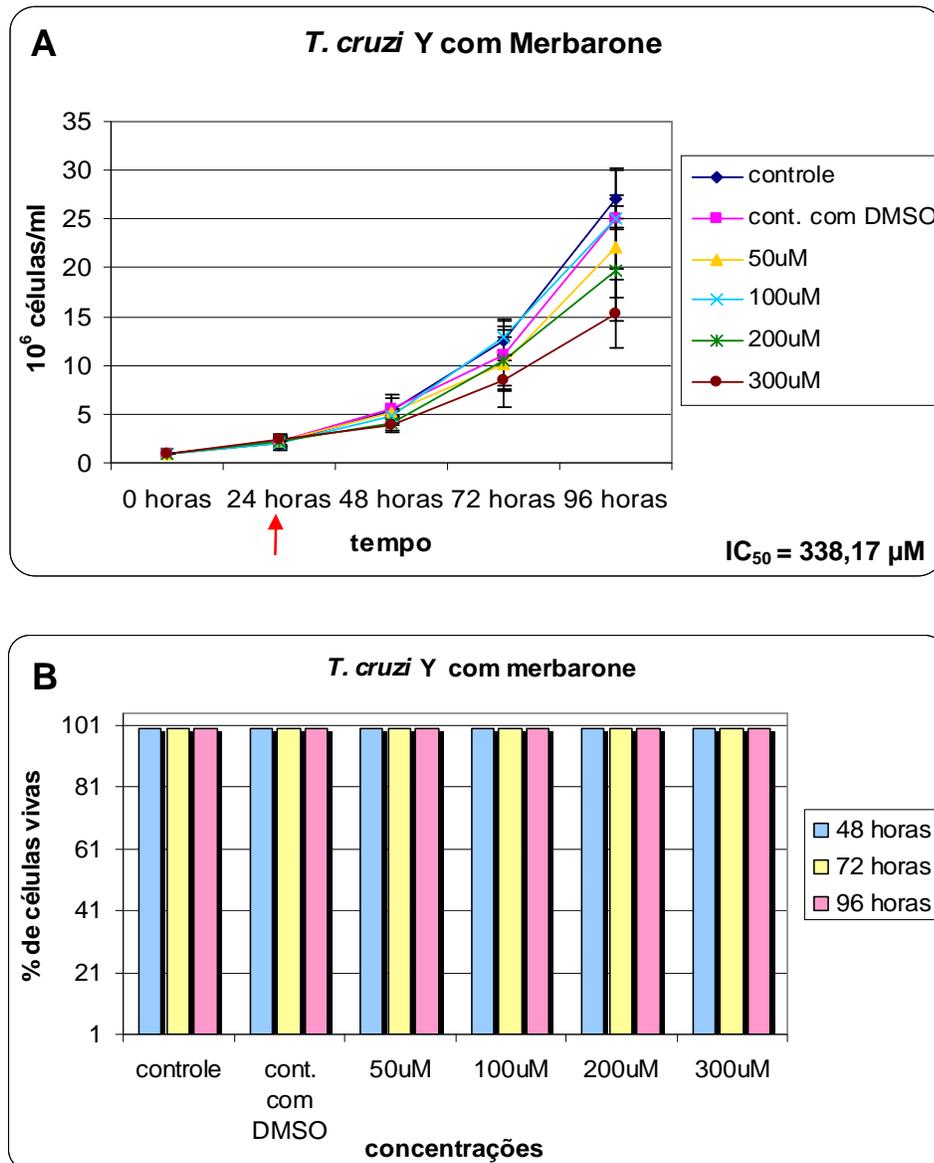


Figura 35: (A) Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com o merbarone. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão; (B) Viabilidade celular dos epimastigotas do *T. cruzi* tratados com o merbarone.

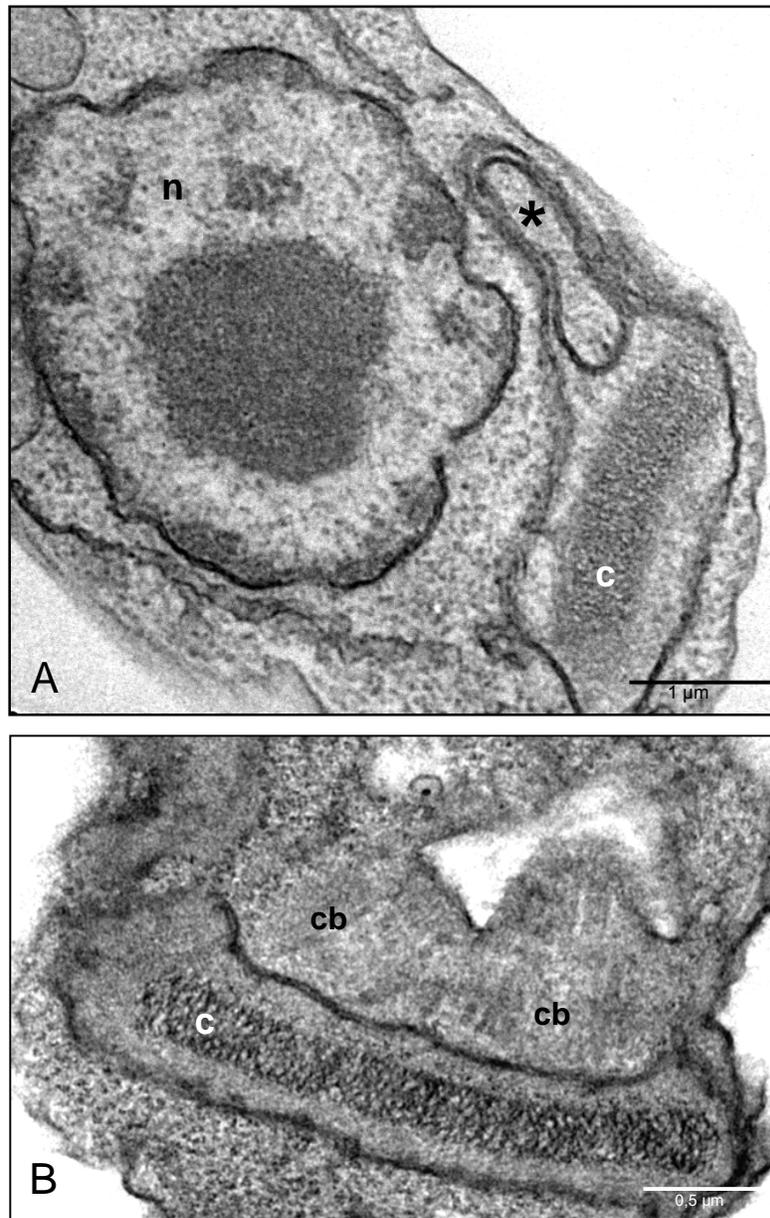


Figura 36: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com merbarone. Em (A), célula tratada com 300 µM por 72 horas mostrando inchaço mitocondrial (asterisco) sem alteração da rede de kDNA. Em (B), cinetoplasto em maior aumento mostrando arranjo semelhante ao controle.

## II. Mitoxantrone

O efeito do mitoxantrone na proliferação da forma epimastigota do *T. cruzi* foi significativamente maior em comparação ao merbarone, o que pode ser observado através do gráfico que representa a curva de crescimento de células tratadas com a droga (figura 37-A). É possível notar que a proliferação celular começou a sofrer inibição logo após 24 horas de tratamento. Nos tempos de 72 e 96 horas de crescimento, esse efeito tornou-se mais forte e não se observou mais a proliferação das células tratadas quando as maiores concentrações da droga foram testadas (10-50  $\mu\text{M}$ ). Interessante notar que a quantidade de células não diminuiu quando foram utilizadas concentrações igual ou superior a 10  $\mu\text{M}$  (figura 37-A). A curva de crescimento do mitoxantrone se assemelha bastante com a da camptotecina, incluindo o valor do  $\text{IC}_{50}$  equivalente a 5,37  $\mu\text{M}$ , o segundo mais baixo entre os compostos testados. O gráfico da viabilidade mostra que não houve alteração das células tratadas por este composto (figura 37-B).

Assim como o merbarone, este composto não causou alterações na ultraestrutura do cinetoplasto ou do núcleo, porém levou à perda de conteúdo dos reservossomos (figura 38), que pôde ser observada com 72 horas de tratamento com a droga. É curioso notar que embora o mitoxantrone seja um inibidor de topoisomerase, o seu efeito principal se deu ao nível de uma organela que não contém DNA.

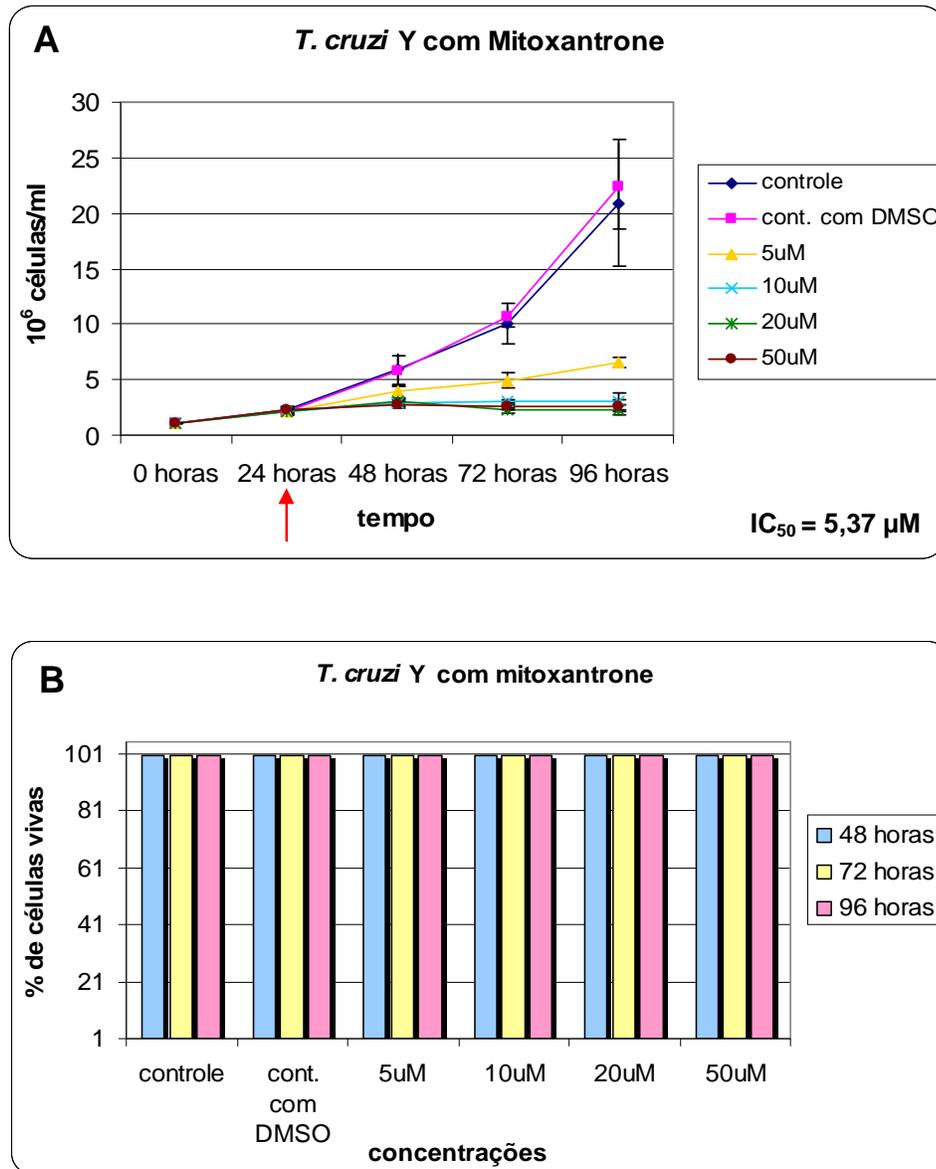


Figura 37: (A) Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* tratado com o mitoxantrone. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão; (B) Viabilidade celular dos epimastigotas de *T. cruzi* tratados com o mitoxantrone.

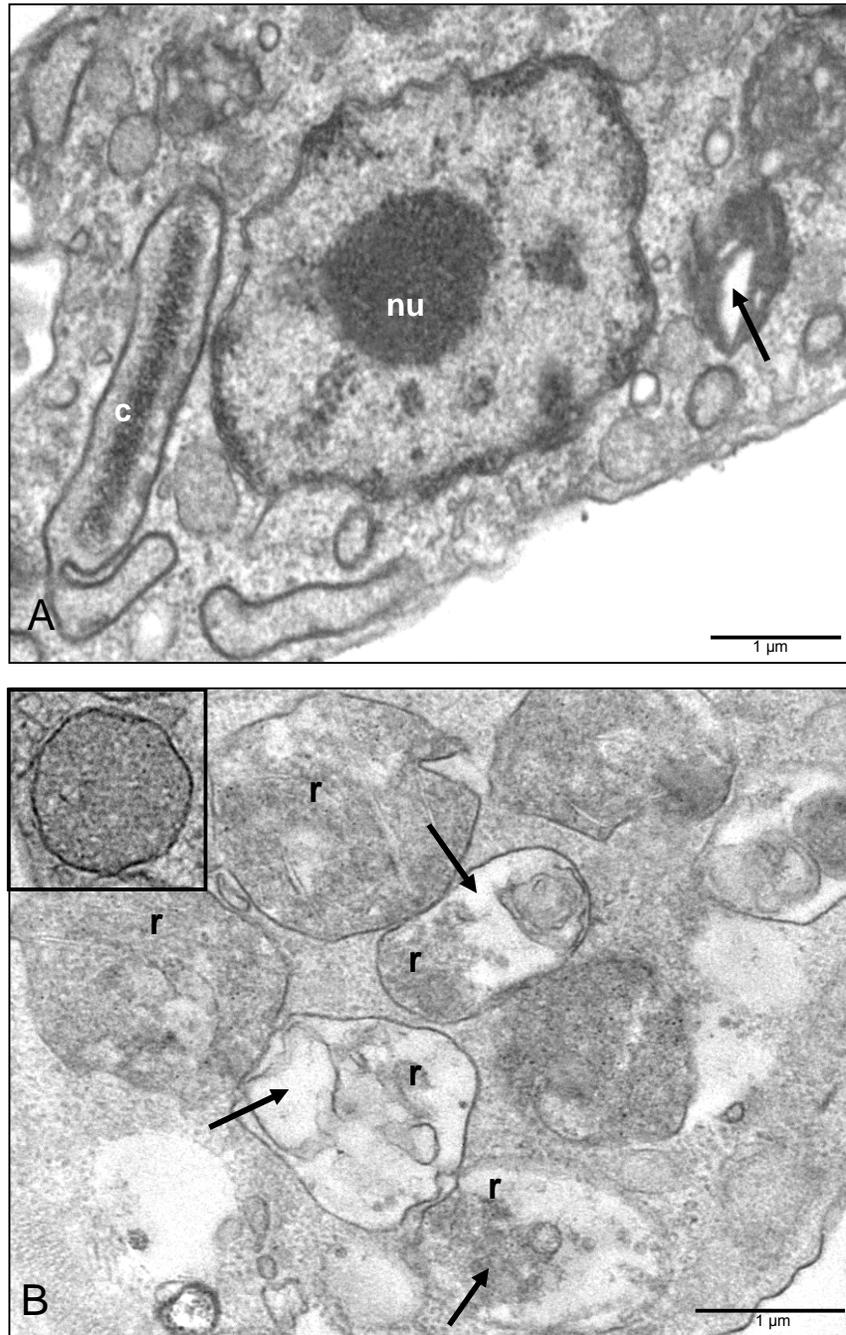


Figura 38: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com mitoxantrone. Em (A) e (B), perda de conteúdo dos reservosomos (setas) dos parasitos tratados com 20 µM por 72 horas. O inset em (B) mostra um reservosomo de uma célula controle.

### 4.3. Inibidores de Topoisomerase II de Procarioto

#### I. Norfloxacinina

O tratamento com a norfloxacinina não promoveu uma grande inibição da proliferação celular na forma epimastigota do *T. cruzi* mesmo após 72 horas de tratamento, exceto em células tratadas com 1560  $\mu\text{M}$  da droga. Como se pode ver no gráfico que representa a curva de crescimento (figura 39-A), o efeito da norfloxacinina foi bem inferior ao da camptotecina, da rebecamicina e do mitoxantrone que apresentaram os mais baixos valores de  $\text{IC}_{50}$ . No caso da norfloxacinina, o  $\text{IC}_{50}$  (974  $\mu\text{M}$ ) é tão alto quanto o observado para o merbarone.

A norfloxacinina foi testada também na *Blastocrithidia culicis*, que vem sendo utilizada pelo nosso grupo como modelo comparativo. Isto porque sabemos que o kDNA desta espécie, e de todos os outros tripanosomatídeos que contêm simbionte, apresenta um arranjo mais frouxo. Este fato parece estar relacionado à maior susceptibilidade destes protozoários à ação de inibidores que têm como alvo o cinetoplasto (Cavalcanti *et al*, 2004; 2008). Quando tratada com a norfloxacinina, a *B. culicis* apresentou uma redução considerável da sua proliferação, como pode ser visto na figura 39-B. Tal inibição é dose-dependente e começou a ser observada logo após as primeiras 24 horas de tratamento com a droga, aumentando nos tempos seguinte. Após 96 horas de crescimento das células em presença de 156  $\mu\text{M}$  de norfloxacinina, havia apenas um terço do número de protozoários quando comparado ao controle. Já o tratamento com 1560  $\mu\text{M}$  (maior concentração testada) pelo mesmo tempo reduziu em nove vezes a proliferação celular. Nestes mesmos pontos da curva de crescimento do *T. cruzi*, observa-se que com 156  $\mu\text{M}$  não houve redução do número de parasitos e com 1560  $\mu\text{M}$  havia apenas três vezes menos células em comparação ao controle (figura 39-A). A viabilidade celular das células tratadas com a

norfloxacina não sofreu alterações, assim como aconteceu no tratamento com as outras drogas (figura 40).

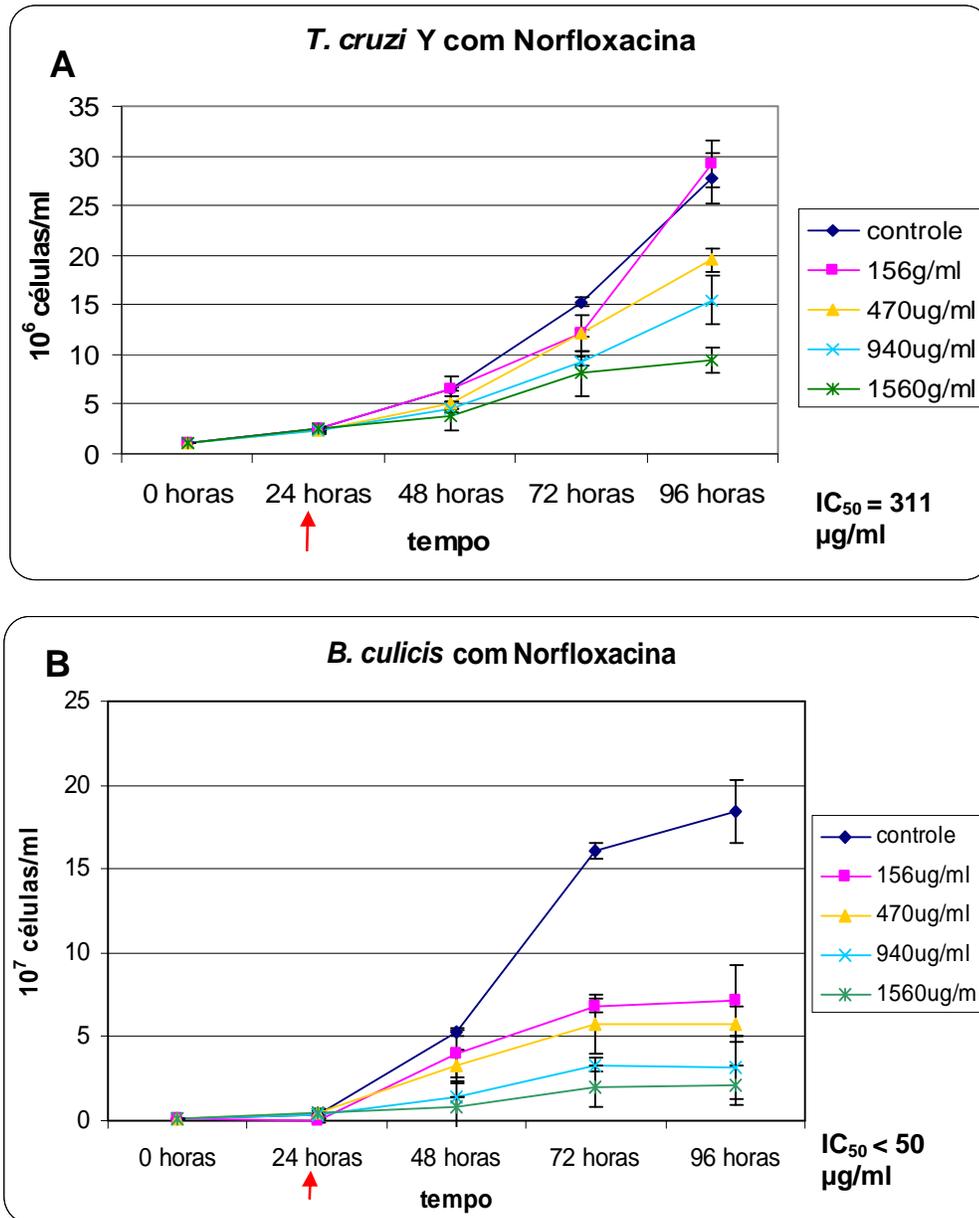


Figura 39: Curvas de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* (A) e da *B. culicis* (B) tratados com a norfloxacina. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão. Observa-se que a norfloxacina tem maior efeito na proliferação celular da *B. culicis* (B) em comparação com o *T. cruzi* (A).

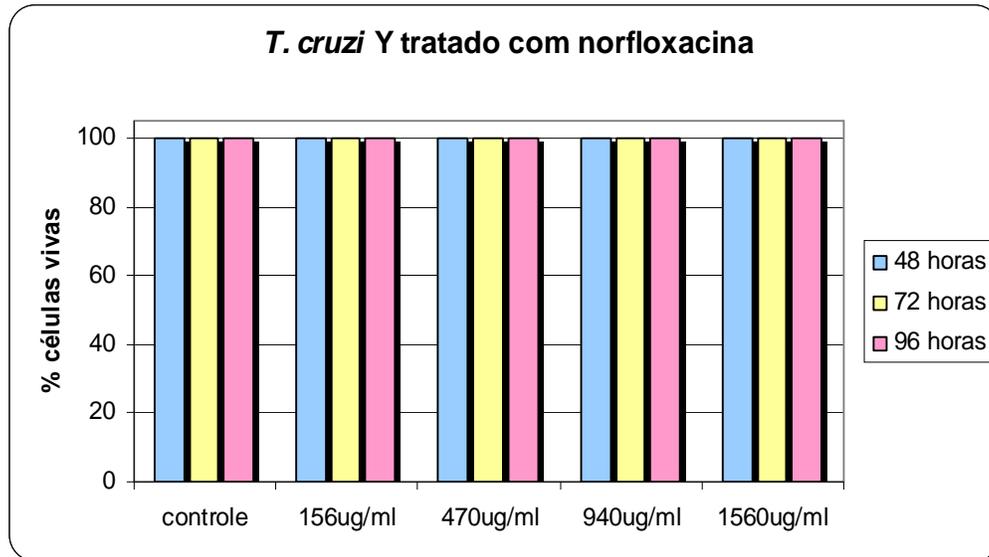


Figura 40: Viabilidade celular da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado a norfloxacin.

O tratamento com a norfloxacin não promoveu alterações ultraestruturais do núcleo, do cinetoplasto e nem da mitocôndria dos epimastigotas de *T. cruzi* (figura 41-A e C). É interessante ressaltar que sendo a norfloxacin um inibidor de topoisomerase do tipo II, que tem fundamental participação na organização e replicação no DNA do cinetoplasto, era esperado que houvesse alguma modificação na topologia do kDNA pela ação inibitória da droga. Contudo, o efeito observado foi a intensa vacuolização do citoplasma de células tratadas (figura 41-A). Já a ultraestrutura do cinetoplasto da *B. culicis* tratada com a norfloxacin sofreu alterações. Como pode ser visto na figura 41-D, a rede de kDNA deste tripanosomatídeo apresentou compactação das fibrilas de DNA e o centro do disco apresentou eletrondensidade maior do que o observado em células controle (comparar figura 41-B e D).

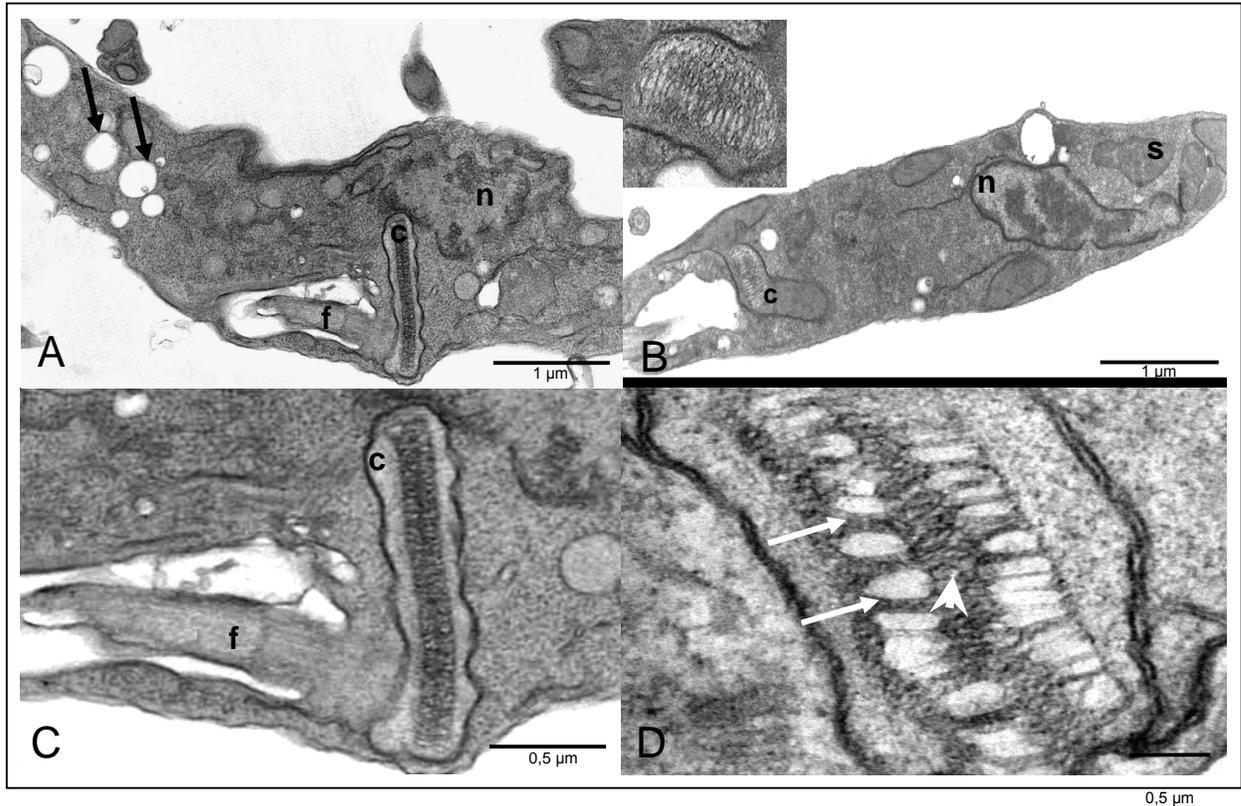


Figura 41: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis* tratados com norfloxacin. Em (A), *T. cruzi* tratado com 470  $\mu\text{M}$  por 48 horas, onde é possível observar a vacuolização do citoplasma (setas); Em (B), controle de *B. culicis*, mostrando o cinetoplasto (c), o núcleo (n) e o simbiote (s). O inset mostra um cinetoplasto em maior aumento; Em (C), cinetoplasto de *T. cruzi* em maior aumento, mostrando o arranjo sem alterações; Em (D), cinetoplasto de *B. culicis* tratada com 940  $\mu\text{M}$  por 72 horas, onde o kDNA apresenta maior compactação (setas). A região central da rede também mostra-se mais eletrondensa e compacta (cabeça de seta branca).

## II. Enoxacina

A enoxacina apresentou um efeito bem mais acentuado na proliferação celular dos epimastigotas de *T. cruzi* quando comparado ao da norfloxacina, que também pertence à mesma classe de inibidores, observando-se um valor de  $IC_{50}$  muitas vezes menor (163  $\mu$ M) (figura 42-A). Com apenas 24 horas de tratamento com a enoxacina já foi possível notar uma queda da proliferação celular em comparação ao controle, sendo esta acentuada nos tempos seguintes. Após tratamento com 156  $\mu$ M de enoxacina por 48 horas, houve queda de 50% no número de parasitos, quando comparado ao controle. Tal resultado só foi obtido com a norfloxacina, após o uso de 940  $\mu$ M por 48 horas. Além disso, a enoxacina apresentou um efeito dose-dependente, que se tornou mais evidente no final da curva de crescimento, quando houve uma grande diferença entre o número de células tratadas em relação ao controle (figura 42-A). As células tratadas pela enoxacina mostraram 100% de viabilidade (figura 43).

Seguindo o mesmo raciocínio dos experimentos feitos com a norfloxacina, a enoxacina também foi testada na *Blastocrithidia culicis*. A curva de crescimento indicou que a *B. culicis* sofreu maior inibição da sua proliferação em comparação ao *T. cruzi*. Esta diferença já pôde ser percebida após 48 horas de tratamento com a menor concentração da droga utilizada (156  $\mu$ M), quando não mais observamos proliferação celular (figura 42-B).

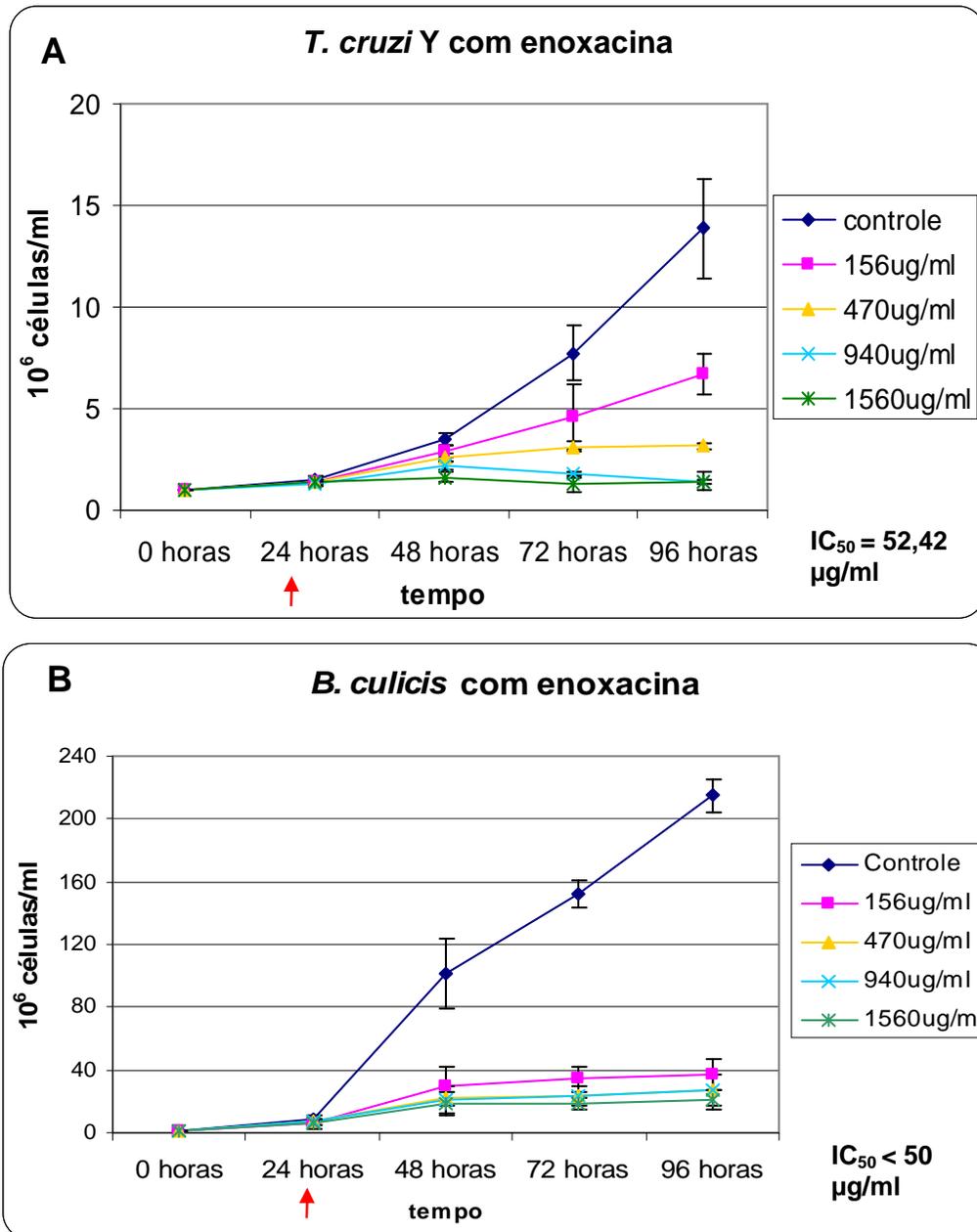


Figura 42: Curvas de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* (A) e da *B. culicis* (B) tratados com a enoxacina. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão. Observa-se que a enoxacina tem maior efeito na inibição da proliferação celular da *B. culicis* (A) em comparação ao *T. cruzi* (B).

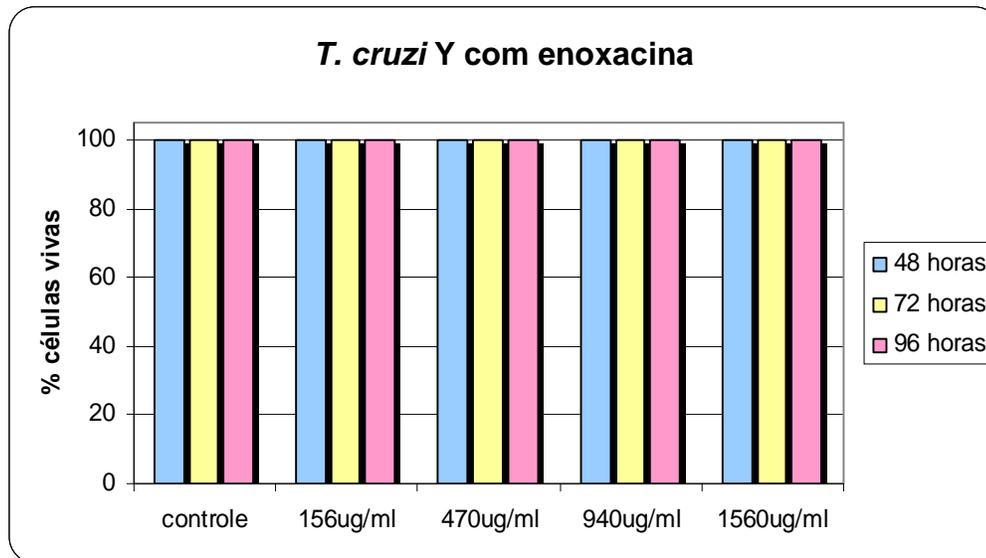


Figura 43: Viabilidade celular da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com a enoxacina.

Em epimastigotas de *T. cruzi*, a ultraestrutura das células tratadas com a enoxacina sofreu um ligeiro afastamento entre as membranas nucleares interna e externa, já observado após o tratamento com 156  $\mu$ M por 48 horas. Apesar disto, a organização do núcleo e do cinetoplasto não foi afetada (figura 44-A). Quanto à ultraestrutura celular de *B. culicis*, houve uma compactação da rede de kDNA em células tratadas (figura 44-B), sendo esta menos intensa do que aquela observada quando estes protozoários foram submetidos ao tratamento com a norfloxacin (figura 41-C).

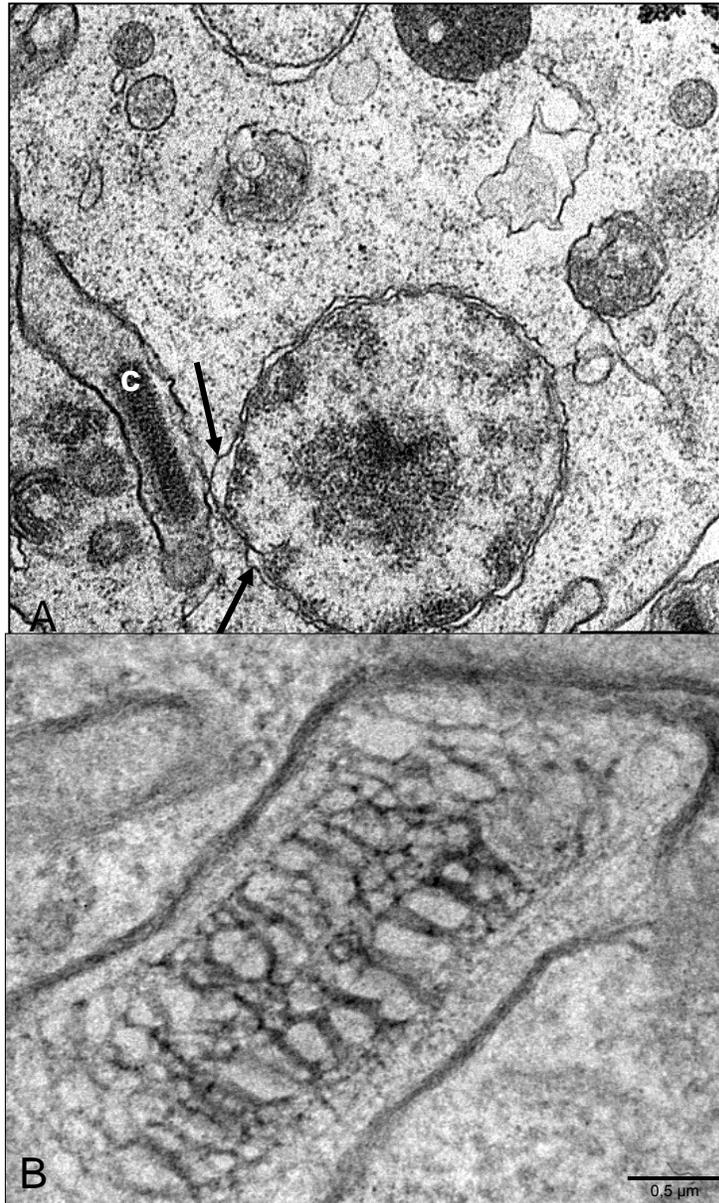


Figura 44: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis* tratados com enoxacina. Em (A), *T. cruzi* tratado com 156 μM por 48 horas. É possível notar o ligeiro afastamento entre as membranas nucleares interna e externa (setas); Em (B), cinetoplasto de *B. culicis* tratada com 940 μM por 48 horas, mostrando uma compactação das fibras do kDNA.

#### 4.4. Drogas Ligantes de DNA

##### I. Berenil

Nas concentrações mais baixas, de 2 e 10  $\mu\text{M}$ , o berenil praticamente não inibiu a proliferação dos epimastigotas de *T. cruzi*, ao contrário das concentrações de 20 e 50  $\mu\text{M}$ , quando foi observada uma redução do número de células tratadas em comparação ao controle, a partir de 48 horas de tratamento (figura 45-A). A curva de crescimento mostra que houve proliferação celular dos epimastigotas tratados, ainda que esta não tenha sido nas mesmas proporções do grupo controle, indicando que mesmo sob a ação do berenil, as células ainda conseguiram se dividir. O teste de viabilidade com azul de tripan mostrou que 100% das células tratadas estavam viáveis (figura 46).

O berenil também foi testado na *B. culicis*, porém o seu efeito não foi maior do que aquele observado no *T. cruzi*, ao contrário do que se esperava, uma vez que a *B. culicis* geralmente é mais sensível à ação de drogas que afetam o cinetoplasto (figura 45-B). A curva de crescimento com a *B. culicis* apresentou um  $\text{IC}_{50}$  (46, 73  $\mu\text{M}$ ) praticamente duas vezes maior do que o obtido no tratamento com o *T. cruzi* (20, 25  $\mu\text{M}$ ).

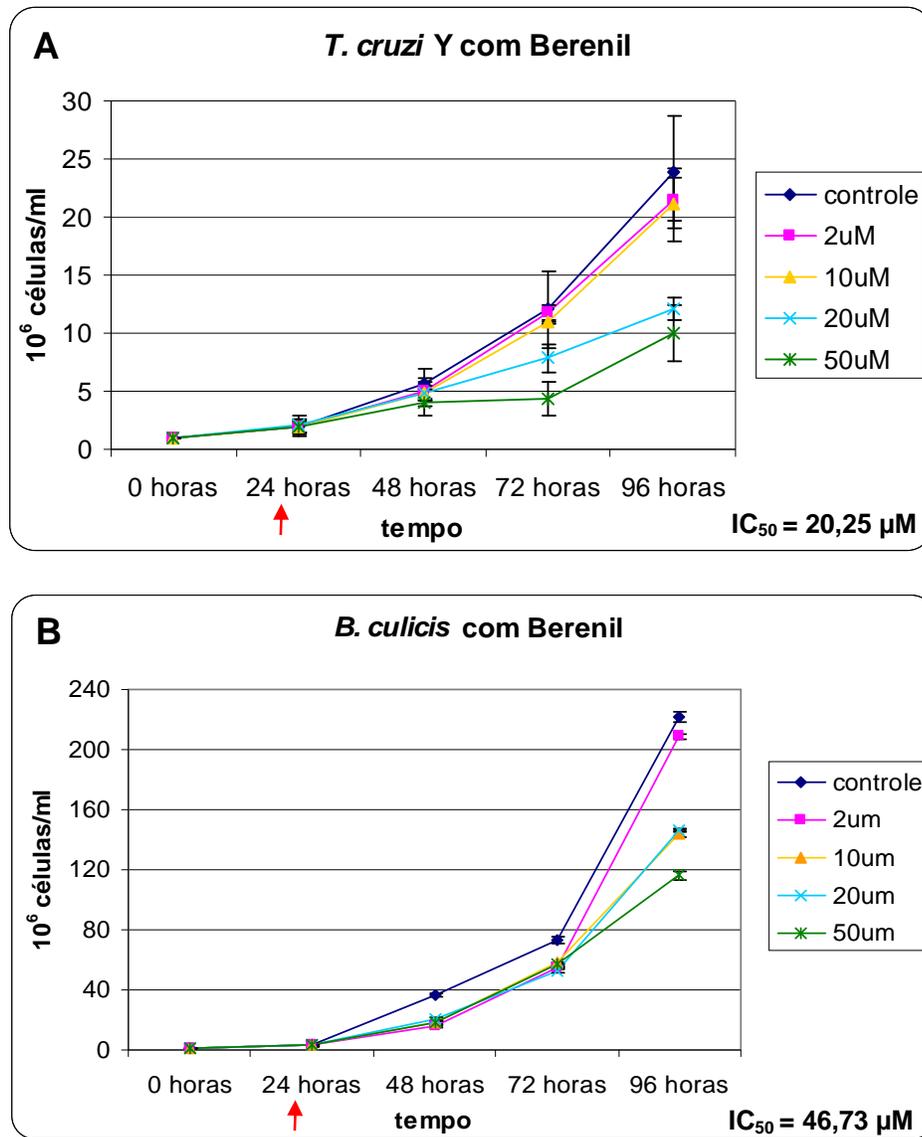


Figura 45: Curvas de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* (A) e da *B. culicis* (B) tratados com o berenil. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão. Neste caso, a *B. culicis* não foi mais susceptível que o *T. cruzi* ao tratamento com este composto.

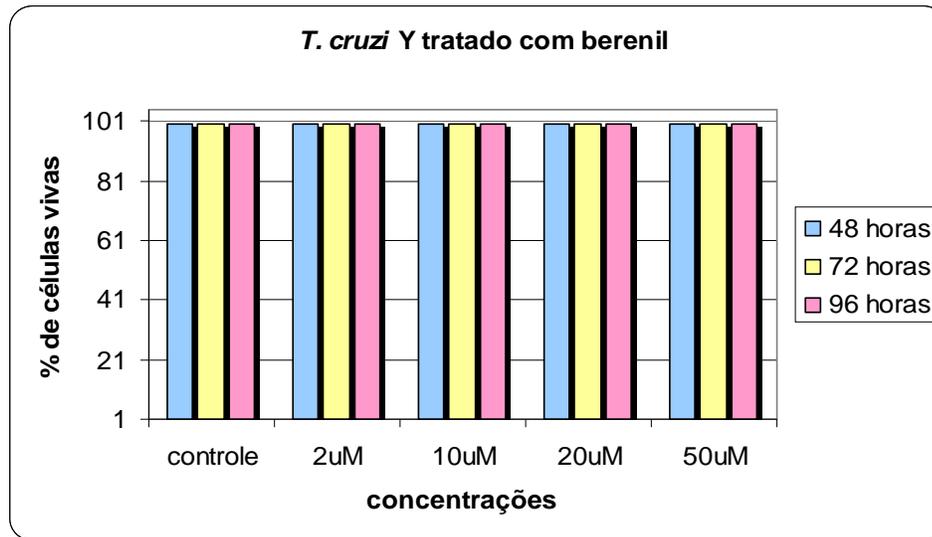


Figura 46: Viabilidade celular da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com o berenil.

Os epimastigotas de *T. cruzi* tratados com berenil sofreram alterações ultraestruturais totalmente diferentes de quaisquer outras descritas anteriormente (figura 47). No início do tratamento com este ligante (48 horas) já se pôde notar o aparecimento de perfis de membrana em meio à rede, que parecem corresponder a invaginações da membrana mitocondrial interna (figura 47-A e B). Observaram-se mudanças na organização do cinetoplasto, onde regiões menos eletrondensas foram observadas geralmente na periferia da rede (figura 47-C e D). Após tratamento mais prolongado (72 horas), ocorreu o aparecimento de inchaço mitocondrial e de um ponto eletrondenso junto ao sítio anti-podal (figura 47-E). Em *B. culicis*, a mudança no arranjo do kDNA é diferente daquela observada em *T. cruzi*. Neste caso, as alterações são semelhantes às observadas após o tratamento da norfloxacina, quando foi observada maior compactação do kDNA e uma região mais eletrondensa no centro da rede (figura 47-F).



Figura 47: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis* tratados com berenil. Em (A), *T. cruzi* tratado com 20  $\mu\text{M}$  por 48 horas. É possível notar a desorganização do arranjo do kDNA; Em (B), cinetoplasto em maior aumento, onde são vistos os perfis de membrana em meio ao kDNA (setas) e a continuidade da membrana mitocondrial interna com um dos perfis (cabeça de seta); Em (C), *T. cruzi* tratado com 20  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Notam-se regiões menos eletrondensas junto a rede de kDNA (seta); Em (D), *T. cruzi* tratado com 10  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Novamente é possível ver os perfis de membrana, além de regiões menos eletrondensas (seta) e inchaço mitocondrial (m); Em (E), *T. cruzi* tratado com 10  $\mu\text{M}$  por 72 horas, mostrando um ponto eletrondenso na região do sítio anti-podal (seta); Em (F), cinetoplasto de *B. culicis* tratada com 10  $\mu\text{M}$  por 72 horas, onde pode-se ver as regiões de maior compactação da rede de kDNA (setas). Notar que a alteração no arranjo do kDNA é diferente daquela observada em *T. cruzi*.

Inicialmente, acreditava-se que as regiões menos eletrondensas do cinetoplasto corresponderiam a sítios de descompactação da rede, através de decatenação, dos maxi e minicírculos que compõem o kDNA. Utilizamos então, a técnica do TdT que identifica o DNA com especificidade. A comparação entre células controle e as tratadas mostraram que as primeiras apresentavam marcação por toda a rede de kDNA (figura 48-A). Porém, observando as imagens das células tratadas, notou-se que a região compactada foi marcada pelas partículas de ouro e aquela que corresponderia à descompactação da rede não apresentou nenhuma marcação (figura 48-B e C). Este resultado indica que a área eletrônica não contém DNA e portanto não pode equivaler a região contendo os maxi e minicírculos decatenados.

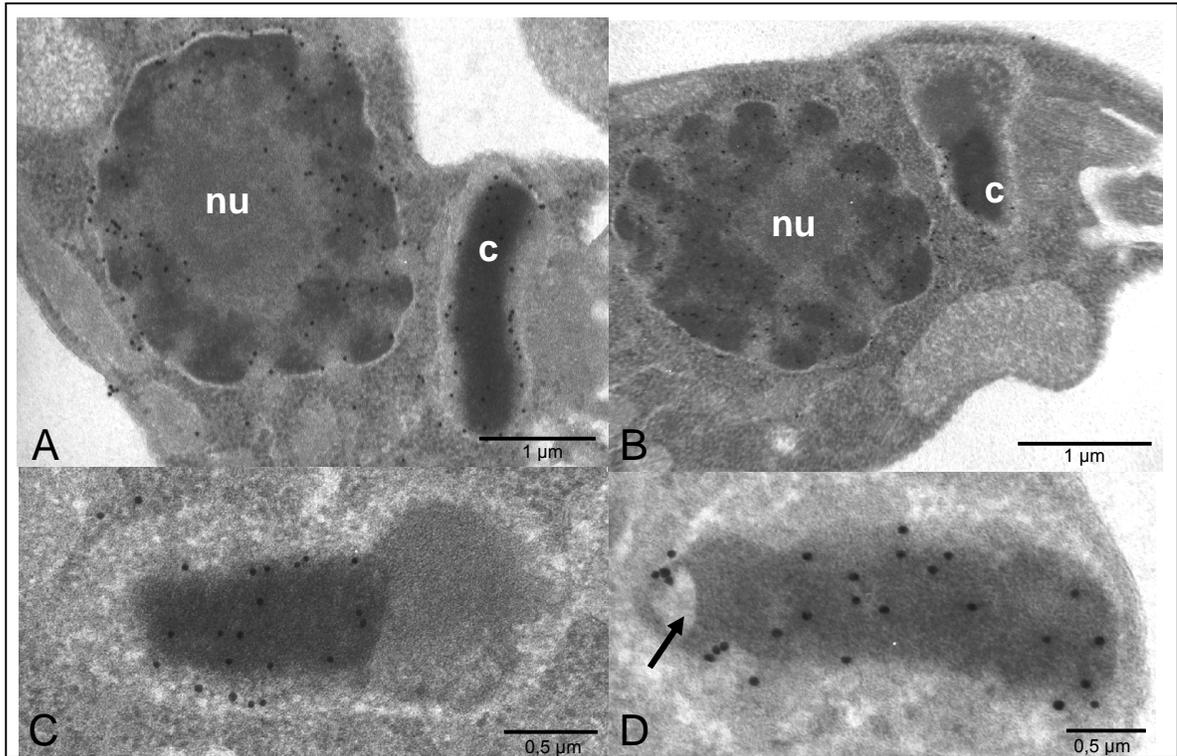


Figura 48: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* submetidos à técnica do TdT. Em (A), célula controle mostrando a marcação na heterocromatina nuclear e ausência de marcação no nucléolo (nu). Notar que também há marcação na rede de kDNA do cinetoplasto. Em (B) e (C) 10  $\mu$ M por 72 horas. Nota-se que a região menos eletrondensa na extremidade do cinetoplasto não foi marcada pelo TdT, indicando não ser composta por DNA. Em (D), célula tratada com 50  $\mu$ M de berenil por 72 horas, onde pode-se observar a marcação distribuída pelo kDNA e uma região que provavelmente contém membrana mitocondrial invaginada (seta).

## II. Distamicina

A distamicina não apresentou resultado equivalente ao berenil, embora sejam compostos incluídos na mesma classe. Considerando o gráfico da curva de crescimento (figura 49-A), a proliferação dos epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com 5, 10, 20 e 40  $\mu$ M por 72 horas é bastante similar, ocorrendo uma ligeira queda no número de protozoários quando a concentração de 100  $\mu$ M foi testada neste mesmo tempo. Inclusive, esta maior concentração do ligante mostrou

efeito semelhante ao observado após tratamento com 20  $\mu\text{M}$  de berenil por 72 horas. De acordo com estes resultados, o valor do  $\text{IC}_{50}$  da distamicina (98, 58  $\mu\text{M}$ ) é quase 5 vezes maior do que o observado para o berenil (20, 25  $\mu\text{M}$ ). Da mesma maneira que o berenil, os resultados na inibição da proliferação só começaram a ser vistos após 72 horas de crescimento, porém de um modo menos pronunciado (comparar as figuras 45-A e 49-A). O efeito da distamicina na proliferação celular de *B. culicis* mostrou-se bastante parecido com o observado em *T. cruzi*, com valores de  $\text{IC}_{50}$  bem próximos entre si (figura 49-B). O teste de viabilidade com azul de tripan mostrou que 100% das células tratadas estavam viáveis (figura 50).

Os epimastigotas tratados com a distamicina não apresentaram mudanças ultraestruturais nem mesmo no cinetoplasto, diferentemente do observado com o berenil (figura 51-A e B). Células de *B. culicis* tratadas com a distamicina sofreram compactação do kDNA, porém não tão intensa quanto aquela que foi observado após o tratamento com o berenil (figura 51-C).

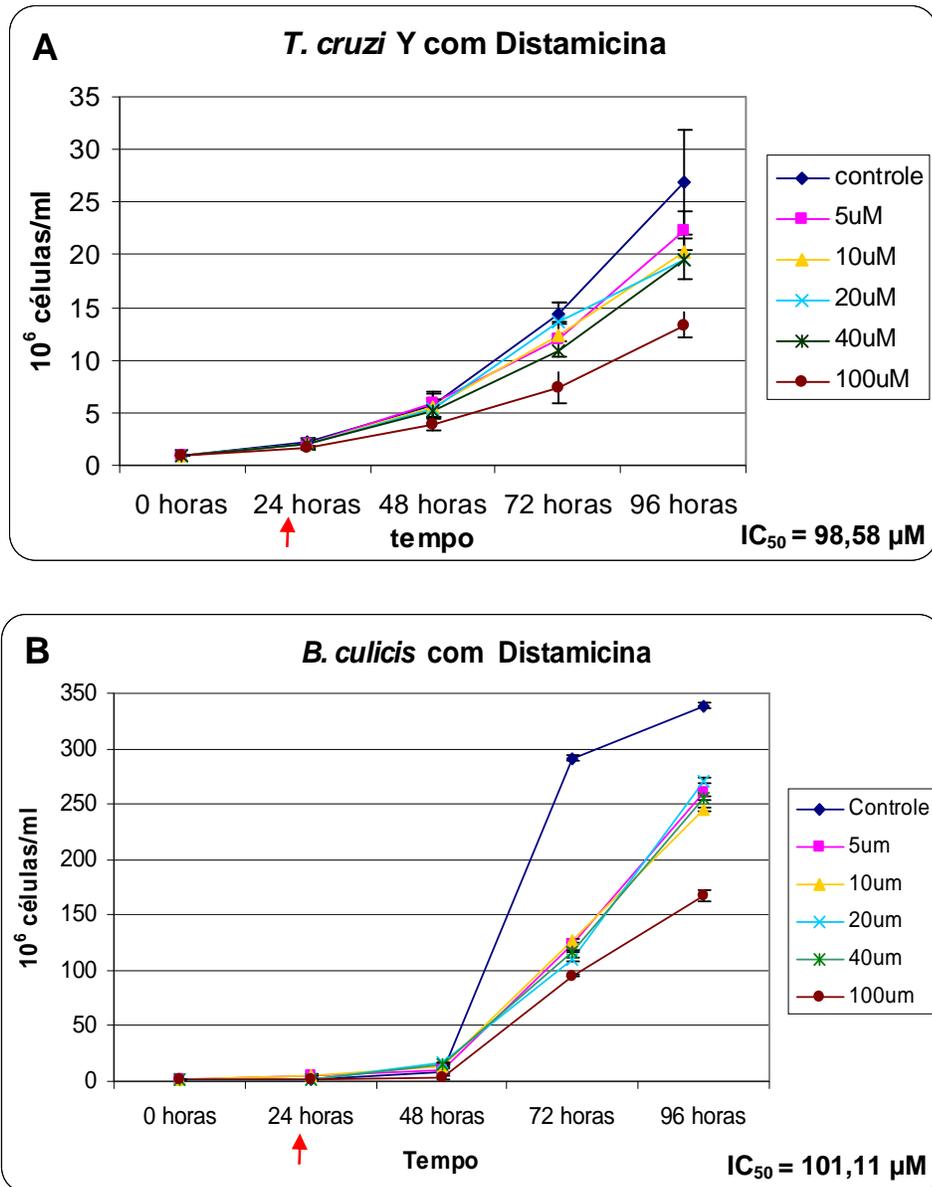


Figura 49: Curvas de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* (A) e da *B. culicis* (B) tratados com a distamicina. A droga foi acrescentada à cultura com 24 horas de crescimento (seta vermelha). Este resultado representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais indicam o desvio padrão. Neste caso, a *B. culicis* não foi mais susceptível que o *T. cruzi* ao tratamento com este composto.

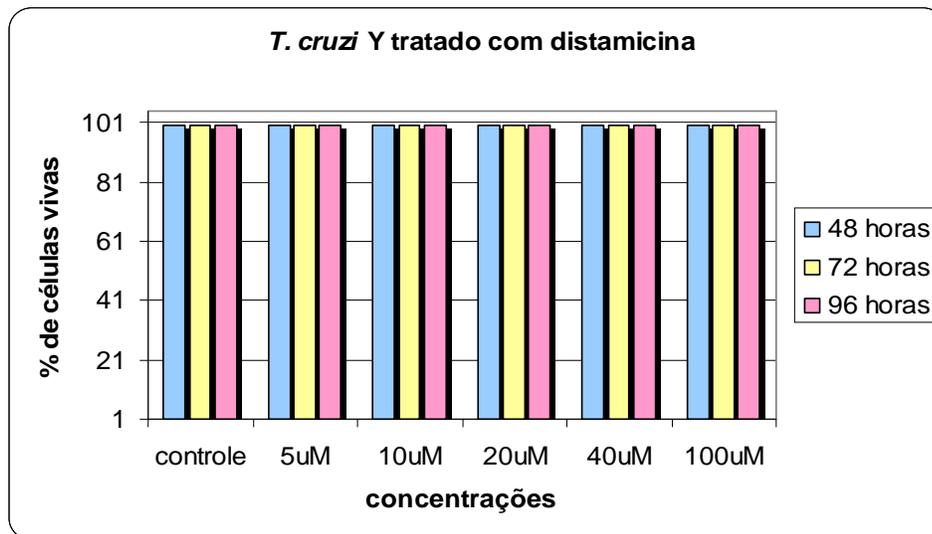


Figura 50: Viabilidade celular da forma epimastigota do *T. cruzi* tratado com a distamicina.

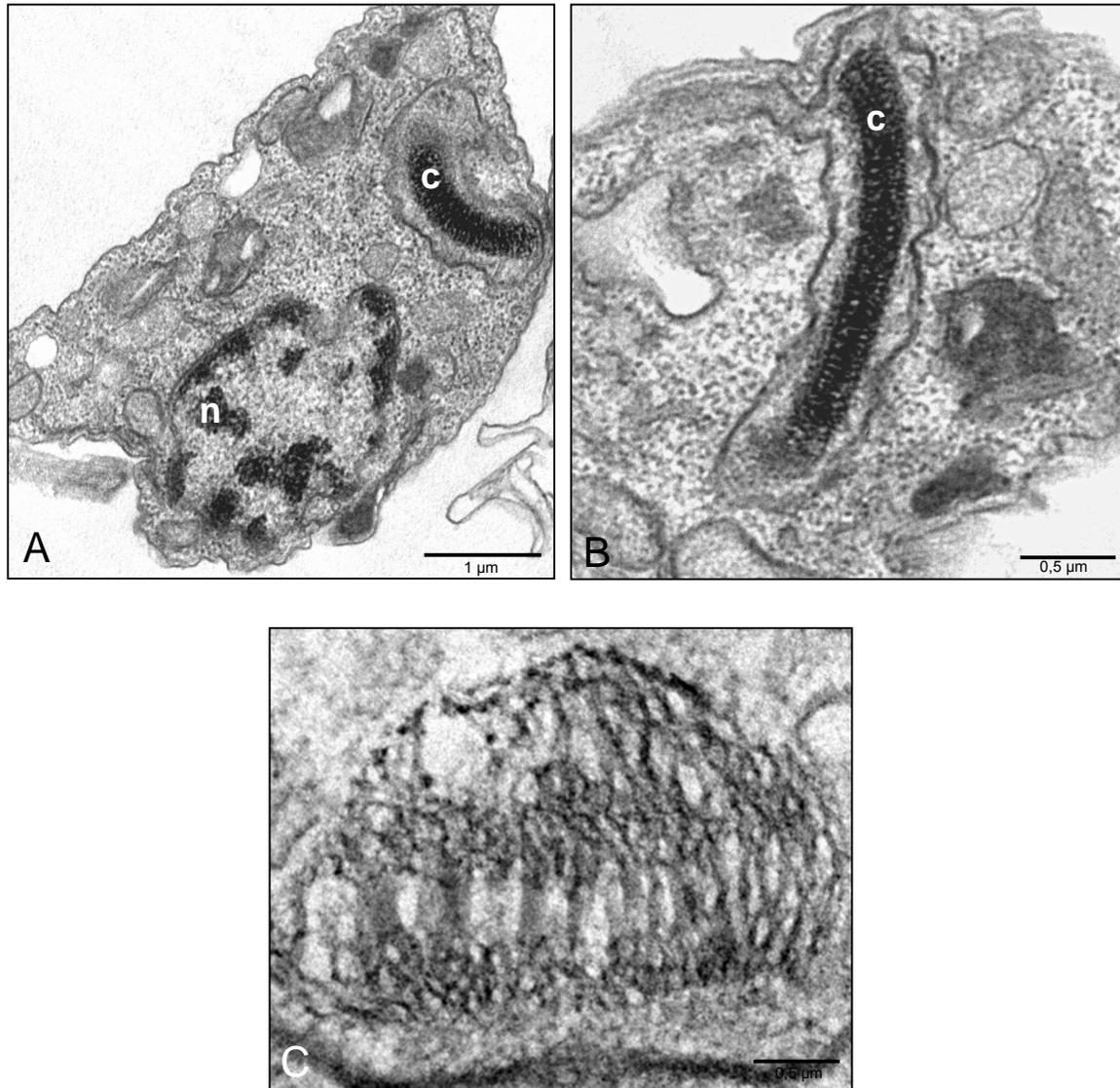


Figura 51: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis* tratados com distamicina. Em (A), *T. cruzi* tratado com 100 μM por 72 horas. Não foram observadas alterações na ultraestrutura do protozoário, nem mesmo no cinetoplasto; Em (B), cinetoplasto de *T. cruzi* em maior aumento mostrando o arranjo sem modificações; Em (C), cinetoplasto de *B. culicis* tratada com 100 μM por 72 horas, mostrando um aumento na compactação do kDNA.

Tabela 4: Inibidores de topoisomerasas e ligantes de DNA testados, segundo a sua classificação, espécies nas quais foram testados, valor de IC<sub>50</sub> e as principais estruturas celulares que sofreram alteração da sua ultraestrutura.

<b>Droga</b>	<b>Classe</b>	<b>Espécie na qual foi testada</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Estruturas celulares alteradas</b>
Camptotecina	Inibidor de topo I de eucarioto	<i>T. cruzi</i>	2,08 µM	Núcleo e mitocôndria
Rebecamicina	Inibidor de topo I de eucarioto	<i>T. cruzi</i>	6,04 µM	Núcleo e mitocôndria
Merbarone	Inibidor de topo II de eucarioto	<i>T. cruzi</i>	338,17 µM	Mitocôndria
Mitoxantrone	Inibidor de topo II de eucarioto	<i>T. cruzi</i>	5,37 µM	Reservossomos
Norfloxacina	Inibidor de topo II de procarioto	<i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i>	974µM; menor que 156 µM	Cinetoplasto ( <i>B. culicis</i> )
Enoxacina	Inibidor de topo II de procarioto	<i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i>	163 µM; menor que 156 µM	Cinetoplasto ( <i>B. culicis</i> )
Berenil	Ligante de DNA	<i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i>	20,25 µM; 46,73 µM	Cinetoplasto
Distamicina	Ligante de DNA	<i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i>	98,58 µM; 101,11 µM	Cinetoplasto ( <i>B. culicis</i> )

## **5. DISCUSSÃO**

As DNA topoisomerasas foram reconhecidas como um alvo promissor na terapia contra o câncer no final da década de 1980 (Diaz-González *et al*, 2009). O interesse nas topoisomerasas está relacionado à participação destas enzimas em diferentes processos celulares essenciais, como na replicação, transcrição e recombinação do DNA. Além disso, a elucidação do mecanismo de ação e a caracterização da estrutura cristalina das topoisomerasas fornecem conhecimentos sobre seu funcionamento, permitindo a identificação e o desenvolvimento de uma ampla variedade de inibidores para estas enzimas (Champoux, 2001; Das *et al*, 2004).

As topoisomerasas se mostram um interessante alvo de drogas contra células tumorais, no entanto, seus efeitos em tripanosomatídeos ainda não foram totalmente explorados. Na literatura há relatos mostrando que as topoisomerasas de tripanosomatídeos se distinguem das topoisomerasas de seu hospedeiro humano, apoiando à ideia de que as drogas que têm como alvo estas enzimas nestes protozoários constituem um potencial objeto de estudo na área de quimioterapia contra estes parasitos (Balaña-Fouce *et al*, 2006).

Um dos inibidores mais amplamente testados e cujos efeitos já foram melhor caracterizados é a camptotecina, que começou a ser usada em células tumorais em meados da década de 1970. Contudo, somente em 1985 é que a topoisomerase I foi apontada como alvo da camptotecina. Até então, acreditava-se que o seu alvo eram as topoisomerasas do tipo II, já que muitos outros agentes antitumorais interferiam na atividade destas enzimas (Hsiang *et al*, 1985; Pommier, 2006).

Com base nos resultados descritos neste trabalho, é possível afirmar a capacidade da camptotecina em inibir intensamente a proliferação celular dos epimastigotas de *T. cruzi*, causando um efeito dose-dependente e apresentando o menor valor de IC<sub>50</sub> (2,08 µM) entre todos os inibidores testados. Resultados similares foram obtidos por Sen *et al* em 2004a, quando a camptotecina foi testada em diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Deste modo, observou-se

que *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* e *L. amazonensis* foram altamente sensíveis à camptotecina em baixas concentrações e após poucas horas de tratamento, chegando a 95% a taxa de inibição da proliferação celular destes protozoários.

Uma característica marcante da curva de crescimento obtida com o tratamento do *T. cruzi* com a camptotecina, foi a formação de um platô após o uso das concentrações de 5, 10 e 50  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Isto indica que o número de células viáveis se manteve praticamente o mesmo, não havendo replicação das células tratadas. Além disto, a curva de reversibilidade sugere que o mecanismo de reparo das células tratadas pode não ter sido suficiente para que os parasitos voltassem a se dividir, considerando a ação irreversível da camptotecina. Exceto em protozoários tratados com 1  $\mu\text{M}$  da camptotecina, pois estes conseguiram crescer novamente após a retirada da droga do meio de cultura. Estes dados sugerem que haja uma interrupção dos mecanismos de replicação, transcrição e reparo de DNA nas células tratadas com a camptotecina.

A camptotecina age se ligando simultaneamente ao DNA, através de interações hidrofóbicas, e à topoisomerase por pontes de hidrogênio, formando assim um complexo ternário, chamado de complexo de clivagem (Pommier, 2006). Inserida nesse complexo, a camptotecina interfere na re-ligação da quebra da fita simples feita pela topoisomerase do tipo I. Deste modo, seu principal mecanismo citotóxico é desencadeado durante a fase S do ciclo celular, devido à colisão entre a forquilha de replicação e o complexo ternário, levando assim à quebra da dupla fita de DNA e causando interrupção do ciclo na fase G2/M, com conseqüente ativação de sinais envolvidos no reparo de DNA (Hsiang *et al*, 1989; Desai *et al*, 2001; Teicher, 2008). O bloqueio do ciclo celular na fase G2/M também pode ocorrer em função da inibição da ativação do complexo p34<sup>cdc2</sup>/ciclina B, responsável por regular a transição entre as fases G2 e mitose. Ainda durante a fase S, a ciclina B se acumula continuamente até a mitose, quando será degradada. Este acúmulo da ciclina B é essencial para a ativação da p34<sup>cdc2</sup> e para a continuidade do ciclo celular.

Porém, na presença da camptotecina não há a degradação da ciclina B, que é mantida em altos níveis ainda na fase G2, logo não ocorre ativação da p34<sup>cdc2</sup>, havendo conseqüente interrupção do ciclo nesta fase (Tsao *et al*, 1992).

Como visto neste trabalho, quando o *T. cruzi* foi tratado por 48 horas com a camptotecina, houve um aumento do número de células que apresentavam características morfológicas da fase G2 do ciclo celular. Deste modo, acredita-se que sob efeito da droga, estes tripanosomatídeos não conseguem dar continuidade ao processo de divisão celular, ficando assim estacionados na fase G2. Parte dos protozoários alcança as etapas seguintes do ciclo celular, pois encontrava-se além da fase S, quando a droga surte maior efeito. É preciso considerar que as células tratadas não estavam sincronizadas, daí não observarmos um efeito sincrônico em toda a cultura.

Os efeitos da camptotecina não estão restritos apenas ao processo de replicação. Durante a transcrição, a topoisomerase é requerida para remover os superenovelamentos do DNA e para participar como co-fator de enzimas que atuam durante o splicing, porém na presença da camptotecina, estas etapas são bloqueadas (Pommier, 2006). Além disso, sabe-se que o uso de elevadas concentrações da droga por tempos prolongados promove apoptose, como já descrito inclusive em tripanosomatídeos (Tsao *et al*, 1992; Sen *et al*, 2004a).

Os mecanismos relacionados à sensibilidade e à resistência de células à camptotecina ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que existe um grande grau de variação dessa sensibilidade/resistência que não está ligada aos níveis do acúmulo da camptotecina e nem ao número de complexos ternários formados, mas sim aos eventos que acontecem após a formação deste complexo. Muitos destes eventos já foram identificados, como a interrupção do ciclo na fase G2, ativação do fator nuclear  $\kappa$ B e estabilização da p53, todos estes ligados a respostas aos danos causados no DNA (Desai *et al*, 2001). Recentemente, foi identificado um evento que não está relacionado a mecanismos de reparo, através do qual a presença da camptotecina induziria a

regulação negativa da topoisomerase I via sistema ubiquitina/proteasoma 26S, através da marcação da enzima com a ubiquitina ou proteínas da família SUMO e conseqüente degradação pelos proteasomas. Quando a topoisomerase I é regulada negativamente, poucos complexos estarão presentes nas células e conseqüentemente, espera-se que estas células sejam mais resistentes ao efeito letal da camptotecina. Dessa forma, este processo tem sido apontado como uma resposta eficaz para neutralizar os efeitos da formação do complexo topo I-camptotecina-DNA (Desai *et al*, 2001).

Observamos no desenvolvimento deste projeto, que a principal modificação ultraestrutural causada pela camptotecina em epimastigotas de *T. cruzi* foi a descompactação da heterocromatina nuclear. Em tripanosomatídeos a heterocromatina organiza-se de maneira muito característica: formando blocos compactos junto ao envoltório nuclear ou na periferia do nucléolo (Heywood & Weinman, 1978). Em células tratadas com camptotecina, a heterocromatina aparece completamente descompactada, algo semelhante ao observado quando o *T. cruzi* é submetido à radiação do tipo  $\gamma$ , sugerindo que mecanismos de reparo foram acionados (Nardelli *et al*, 2009). Não menos freqüente, após o tratamento com a camptotecina foi observado inchaço mitocondrial, porém a organização do kDNA permaneceu inalterada. Este mesmo efeito foi relatado por Sen *et al* em 2004a em *L. donovani*, além de DNA nuclear descompactado e presença de *blebs* de membrana, sendo que este último efeito não foi observado em *T. cruzi*.

A rebecamicina está incluída na classe dos indolocarbazoles, que apresentam um grande potencial antitumoral. Estes compostos são inibidores de topoisomerase I não derivados da camptotecina e estão em fase avançada nas pesquisas clínicas contra o câncer (Pommier *et al*, 2006). A rebecamicina inibiu a proliferação celular do *T. cruzi* de forma muito parecida com a camptotecina. Nota-se que também houve um platô na curva de crescimento e um  $IC_{50}$  bem

baixo. Além dos efeitos em células tumorais e no *T. cruzi*, a rebecamicina apresenta baixo valor de IC<sub>50</sub> no tratamento contra a forma sanguínea do *T. brucei* (Deterding *et al*, 2005). No presente estudo, observamos que as alterações ultraestruturais causadas pela rebecamicina foram equivalentes às aquelas ocasionadas pela camptotecina, como inchaço mitocondrial sem modificação da organização do kDNA e descompactação da heterocromatina. No entanto os efeitos apresentados foram menos intensos e apareceram quando maiores concentrações da droga foram usadas em tempos mais prolongados de tratamento.

Analisando os efeitos da camptotecina e da rebecamicina em epimastigotas do *T. cruzi*, observamos que apesar das alterações mitocondriais, a rede de kDNA manteve a sua topologia. De acordo com os dados da literatura, a organização do kDNA conta com a participação principal da topoisomerase do tipo II e não com a topoisomerase do tipo I (Liu *et al*, 2005), que é o alvo destes compostos. Isto explicaria em parte, a conservação do arranjo do kDNA nas células tratadas por estes dois inibidores.

O merbarone, um inibidor da topoisomerase do tipo II de eucariotos, teve efeito muito inferior aos demais compostos testados. Mesmo em concentrações elevadas, observamos pouca inibição da proliferação celular dos epimastigotas do *T. cruzi*. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que as alterações ultraestruturais das células tratadas se resumiram ao inchaço mitocondrial. Este composto age impedindo que a topoisomerase II religue a quebra da dupla-fita de DNA, o que torna esta enzima um importante alvo desta droga (Fortune & Osheroff, 1998). Os efeitos do merbarone são mais conhecidos em células tumorais, nas quais este inibidor se mostra mais eficaz contra a topoisomerase do tipo II do que contra o mesmo tipo de enzima em eucariotos inferiores. Foi demonstrado que em humanos a inibição do relaxamento do superenovelamento negativo feito pela topoisomerase II ocorreu com o uso de apenas 40 µM

(IC<sub>50</sub>) da droga, já em levedura e *Drosophila*, estes valores subiram para 700 e 350 µM, respectivamente (Fortune & Osheroff, 1998).

O mitoxantrone, que também é um inibidor da topoisomerase do tipo II de eucariotos, foi um dos três compostos que apresentaram melhor efeito inibitório na proliferação celular do *T. cruzi*. De modo semelhante ao observado nos tratamentos com a camptotecina e a rebecamicina, a curva de crescimento também apresentou um platô, indicando que não houve proliferação dos parasitos tratados. Em 2005, Deterding *et al* demonstraram que o mitoxantrone tem alto efeito tripanomicida contra a forma sanguínea do *T. brucei*, apresentando desempenho equivalente ao de outras duas drogas (pentamidina e suramina) usadas comercialmente contra este parasito. Apesar de ser um inibidor de topoisomerase, o mitoxantrone não acarretou modificações ultraestruturais nem no núcleo, nem no cinetoplasto. Apenas os reservosomos apareceram alterados mostrando perda de conteúdo, o que pode estar relacionado com a ativação do processo de diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota. Esta diferenciação pode ser desencadeada pelo estresse causado pela presença da droga no meio de cultura.

A norfloxacinina pertence à classe das quinolonas, compostos com atividade bactericida conhecida, cujo alvo é a topoisomerase do tipo II de procariotos, também conhecida como girase (Schaeffer, 2002). A topoisomerase do tipo II é essencial para a sobrevivência dos tripanosomatídeos, o que é demonstrado pelo fato de inibidores da topo II, tanto de eucariotos como de procariotos, interromperem a proliferação e a diferenciação celular, além de promoverem alterações na ultraestrutura da rede de kDNA destes protozoários (González-Perdomo *et al*, 1990; Cavalcanti *et al*, 2004). Apesar do seu efeito conhecido sobre as topoisomerasas do tipo II, o resultado obtido com a norfloxacinina foi inferior ao esperado, uma vez que outros compostos que também pertencem ao grupo das quinolonas, como o ácido nalidíxico e a novobiocina se mostraram mais eficazes em inibir a proliferação celular do *T.*

*cruzi*. Isto porque, o ácido nalidíxico foi capaz de inibir 50% da proliferação de epimastigotas na concentração de 246 µg/ml e a novobiocina causou lise de parasitos após tratamento com 940 µM (300 µg/ml) e 1560 µM (500 µg/ml) da droga (Cavalcanti *et al*, 2004). Já com a norfloxacina, observamos que a inibição de 50% só foi obtida após o uso de 974 µM (311 µg/ml) e não houve lise das células tratadas nem mesmo quando a concentração testada foi de 1560 µM (500 µg/ml).

A respeito da *B. culicis*, que foi usada como modelo comparativo, a inibição da proliferação provocada pela norfloxacina foi bem maior do que a observada com o *T. cruzi*, sugerindo que esta primeira espécie seja mais sensível ao efeito deste composto. A maior susceptibilidade da *B. culicis* aos inibidores de topoisomerase II de procariotos também foi reportada por Cavalcanti *et al* em 2004, ao testarem o ácido nalidíxico e concluírem que este protozoário sofreu queda na sua proliferação a partir do tratamento com este inibidor.

Além de não interferir em grande escala na proliferação celular, a norfloxacina não modificou significativamente a ultraestrutura do *T. cruzi*, isto porque a única alteração observada foi a vacuolização do citoplasma, ao contrário do ácido nalidíxico e da novobiocina que promoveram leve compactação das fibras do kDNA e seu destacamento da membrana do cinetoplasto, respectivamente. Já a *B. culicis* se mostrou mais sensível aos efeitos da norfloxacina, com alterações no arranjo do kDNA, que tornou-se bem mais compacto, tal como foi relatado com o ácido nalidíxico (Cavalcanti *et al*, 2004). O efeito mais pronunciado na organização das fibrilas de DNA que compõem o cinetoplasto de *B. culicis*, pode estar relacionado ao arranjo mais frouxo, que facilitaria o acesso da droga, ou seja, a sua ligação ao kDNA.

A enoxacina se mostrou mais eficaz em inibir a proliferação celular do *T. cruzi* em comparação com a norfloxacina. De acordo com a curva de crescimento, a enoxacina parece agir de modo mais rápido, pois seu efeito já pôde ser observado após as primeiras 24 horas de

tratamento com a droga. Além disto, o crescimento celular foi bastante afetado, mesmo após o uso de concentrações mais baixas (como 156 e 1560  $\mu\text{M}$ ), o que não foi visto com após o tratamento com a norfloxacin. Quando comparada com outras quinolonas que possuem atividade anti-proliferativa em *T. cruzi*, como o ácido nalidíxico, a taxa de inibição da enoxacina foi maior do que a destes dois compostos. O tratamento com 50  $\mu\text{g/ml}$  de enoxacina por 72 horas foi suficiente para inibir a proliferação em 50%, fato este que só aconteceu com concentrações 5 e 6 vezes maiores do ácido nalidíxico e da novobiocina, respectivamente. Em *B. culicis*, os resultados obtidos com a norfloxacin coincidem com aqueles descritos para o ácido nalidíxico (Cavalcanti *et al*, 2004). No entanto, a enoxacina foi o inibidor de topoisomerase II de procarionto que causou maior queda na proliferação celular da *B. culicis*.

Apesar de apresentar um efeito considerável na proliferação celular, a enoxacina não promoveu alterações significativas na ultraestrutura do kDNA no *T. cruzi*, diferentemente do ácido nalidíxico que foi testado por Cavalcanti e colaboradores em 2004. As modificações vistas foram uma maior compactação do kDNA da *B. culicis* e o afastamento entre as membranas interna e externa do núcleo observado em ambas as espécies de protozoários.

Os relatos sobre o tratamento com o berenil em tripanosomatídeos descrevem efeitos associados preferencialmente a rede de kDNA. Tal especificidade pode ser explicada pelo fato do berenil se ligar aos sítios ricos em adenina e timina, que constituem cerca de 60% do DNA do cinetoplasto. Quando ligado à região do sulco menor do DNA, o berenil impede que a topoisomerase do tipo II interaja com o kDNA, o que pode ser considerado um dos fatores responsáveis pelos efeitos tóxicos provocados por este composto (Brack *et al*, 1972). O berenil foi capaz de inibir a atividade da topoisomerase do tipo II em epimastigotas de *T. cruzi*: 20  $\mu\text{M}$  promoveram 51% de inibição da atividade da enzima, já o uso de 200  $\mu\text{M}$  de berenil, resultou em percentual inibitório de 90%. Contudo, a taxa de inibição da atividade da topoisomerase II não

aumentou acima desta concentração, sugerindo que o berenil reduz, porém não abole completamente, a atividade da enzima (Portugal, 1994). No presente trabalho, o tratamento da forma epimastigota de *T. cruzi* com o berenil, mostrou maior efeito na inibição da proliferação após o uso de concentração igual ou superior a 20  $\mu\text{M}$ . Esta concentração corresponde ao  $\text{IC}_{50}$  encontrado (20,25  $\mu\text{M}$ ) e coincide com o que foi relatado anteriormente por Portugal, 1994. Já em *B. culicis*, o berenil não causou queda da proliferação celular e seu efeito foi ainda menor do que aquele provocado em *T. cruzi*, ao contrário do que foi observado com os inibidores de topoisomerase do tipo II de procarioto.

O efeito do berenil no *T. cruzi* que mais chamou a atenção não foi com relação à queda da proliferação, mas sim quanto a modificação na ultraestrutura do cinetoplasto dos parasitos tratados. Observa-se uma desorganização atípica do arranjo do kDNA, que não foi vista após o tratamento com nenhum outro inibidor testado. Considerando o tempo e a concentração da droga, a desorganização da rede aconteceu gradativamente, intensificando-se até o aparecimento de uma região menos eletrondensa, tanto no meio da rede, como nas suas extremidades, que equivalem aos sítios anti-podais. Este rearranjo poderia equivaler a decatenação, ou liberação, dos maxi e minicírculos da rede de kDNA que compõem o cinetoplasto. Entretanto, os resultados obtidos a partir da técnica imunocitoquímica do TdT, mostraram que tais regiões não contêm DNA, logo não podem corresponder a sítios que possuem círculos decatenados. Além destes, outros efeitos observados foram a invaginação da membrana mitocondrial interna e a presença de um ponto mais eletrondenso localizado lateralmente ao kDNA, que poderia equivaler a uma concentração de enzimas que atuam na replicação do cinetoplasto, como a topo II, a pol  $\beta$  e a primase.

O efeito do berenil na ultraestrutura da *B. culicis* foi similar ao observado em protozoários tratados com a norfloxacin, o ácido nalidíxico e a novobiocina, ou seja, o kDNA apresentou-se mais compactado. É interessante notar que mesmo não impedindo a proliferação celular nas

mesmas proporções dos outros inibidores, o berenil causou o mesmo tipo de modificação ultraestrutural. O que também chama a atenção neste caso é que o berenil produz efeitos diferentes no *T. cruzi* e na *B. culicis*. Enquanto no *T. cruzi* a região que abriga o kDNA apresentou regiões com diminuição da eletrondensidade, na *B. culicis* o efeito foi de compactação do kDNA. Este fato pode estar relacionado às diferenças topológicas apresentadas pelo DNA do cinetoplasto nestas duas espécies.

Em 1972, Brack e colaboradores constataram que o kDNA do *T. cruzi* tratado com o berenil por 4 dias apresentava um aumento na proporção do número de minicírculos que estavam em replicação. Este relato vai de encontro aos dados obtidos por Portugal (1994), que mostrou que o berenil impede a liberação dos minicírculos que precisam ser replicados. Desse modo, a hipótese da decatenação das moléculas circulares do kDNA após tratamento com o berenil poderia ser descartada por dois motivos: primeiro pela ausência de marcação com o TdT nas regiões de menor eletrondensidade do cinetoplasto e segundo pelo fato desta droga ser capaz de impedir a liberação dos maxi e minicírculos da rede. Assim, estes dados dão margem para outras investigações, como verificar a presença e acúmulo de proteínas, ou ainda de RNA, nas regiões eletrônicas onde a ultraestrutura do cinetoplasto foi alterada. Outro efeito do berenil, descrito por Delain *et al* em 1971, diz respeito ao aparecimento de células discinetoplásticas, ou seja, células que retêm as membranas mitocondriais, mas que perdem o conteúdo do kDNA. Este relato vai de acordo com o que foi mencionado acima, pois uma vez que os minicírculos não são liberados da rede, não há como ocorrer duplicação e posterior distribuição deste material genético entre as células-filhas, resultando assim no aparecimento de células sem DNA mitocondrial.

A distamicina, ainda que seja um composto da mesma classe que o berenil, apresentou menor efeito tanto na proliferação, como na ultraestrutura do *T. cruzi*, o mesmo ocorrendo com a *B. culicis*, que costuma ser mais sensível à ação de drogas que têm o cinetoplasto como alvo.

Considerando o efeito das drogas ligantes do DNA, o berenil e a distamicina não inibiram a proliferação da *B. culicis* tanto quanto a norfloxacin e a enoxacin, que mostram efeitos similares aos do ácido nalidíxico. Estes resultados corroboram a idéia de que os inibidores de topoisomerases do tipo II de procariotos costumam apresentar maior efeito sobre a proliferação da *B. culicis* (Cavalcanti *et al*, 2004).

É importante notar que alguns compostos pertencentes à mesma classe tiveram efeitos diferentes, tanto na proliferação celular como na ultraestrutura. Entre eles estão: o merbarone e o mitoxantrone, ambos inibidores de topoisomerases do tipo II de eucarioto, porém o mitoxantrone inibiu cerca de 6 vezes mais a proliferação do *T. cruzi* do que o merbarone. O mesmo foi observado para as drogas ligantes de DNA, como o berenil e a distamicina, pois o berenil foi mais eficiente na inibição da proliferação celular e ao promover notáveis alterações na ultraestrutura dos tripanosomatídeos tratados, o que não foi observado com a distamicina. Tais diferenças podem estar relacionadas às propriedades químicas de cada composto, à permeabilidade das células a drogas, à sensibilidade dos protozoários a topoisomerases e à própria afinidade da droga pelo seu alvo.

Ainda que os inibidores testados tenham provocado as mais diversas modificações ultraestruturais e mesmo aqueles que não causaram grandes mudanças, houve um efeito comum a praticamente todos eles, que foi o inchaço mitocondrial. Isto mostra que a mitocôndria de tripanosomatídeos é susceptível a uma série de compostos e não é por acaso que esta organela tem sido estudada como alvo quimioterápico nos últimos 20 anos. E ainda, o que contribui para o grande interesse nesta organela são os importantes papéis desempenhados por ela, tais como o metabolismo de fosforilação oxidativa que resulta na produção de ATP (Sen & Majumder, 2008).

Nos últimos anos a pesquisa para o tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos, como é o caso da doença de Chagas, vem avançando consideravelmente.

Toda essa pesquisa inclui o desenvolvimento e a aplicação de drogas, o conhecimento das suas moléculas alvo e a compreensão dos seus mecanismos de ação. Entre estas drogas testadas, muitas delas são usadas contra células tumorais, sendo as topoisomerases dos tipos I e II um alvo importante. Uma vez que essas enzimas são essenciais para diversos processos biológicos que envolvem o DNA, é crescente o interesse em estudá-las como alvo quimioterápico, o que vem ganhando força a partir da aplicação de diferentes terapias com resultados satisfatórios. No geral, as topoisomerases dos tripanosomatídeos têm muitas características em comum com as enzimas humanas, no entanto existem pequenas diferenças que as distinguem e que incentivam o desenvolvimento de novos quimioterápicos contra estes protozoários. Justo por isso, essas enzimas constituem um alvo essencial para o futuro controle terapêutico de parasitos causadores de doenças negligenciáveis, que ainda não receberam a devida atenção que merecem.

## **6. CONCLUSÕES**

- Entre as 4 classes de compostos testados, os inibidores de topoisomerase I de eucariotos, como a camptotecina e a rebecamicina, foram os que mostraram maior efeito na proliferação celular de epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando os valores de IC<sub>50</sub> mais baixos.
- A camptotecina foi o composto que causou maior inibição da proliferação celular em *T. cruzi*, além de promover parada na fase G2 do ciclo celular. Ao nível ultraestrutural, esta droga promoveu intensa descompactação da heterocromatina nuclear, sugerindo a ativação de mecanismos de reparo do DNA.
- O mitoxantrone foi um dos compostos que apresentou melhor resultado contra a proliferação celular. Entre todos os demais, que não são inibidores de topo I de eucariotos, foi aquele que mostrou menor valor de IC<sub>50</sub>.
- A *B. culicis* foi mais sensível ao tratamento com inibidores de topoisomerase do tipo II de procarioto em comparação ao *T. cruzi*, apresentando maior queda na proliferação celular e modificações evidentes no arranjo do kDNA.
- Inibidores de topo II de procariotos não ocasionaram mudanças na organização do kDNA do *T. cruzi*, o que pode estar relacionado ao arranjo bem compactado de suas fibras.
- O berenil levou a uma notável desorganização do kDNA e ao aparecimento de invaginações da membrana interna mitocondrial, como observado em *T. cruzi*. Já *B. culicis* mostrou maior compactação do kDNA. Estes efeitos diversos nas duas espécies de tripanosomatídeos podem

estar associados a diferenças no arranjo topológico que o DNA do cinetoplasto apresenta em cada uma delas.

- Os efeitos observados pela camptotecina na proliferação celular e na ultraestrutura nuclear, assim como as alterações promovidas pelo berenil no cinetoplasto, suscitam interesse no estudo dos mecanismos de ação destas drogas em tripanosomatídeos.
  
- Compostos pertencentes à mesma classe apresentam efeitos distintos na proliferação e na ultraestrutura, o que pode estar relacionado à permeabilidade celular e à sensibilidade das topoisomerasas dos tripanosomatídeos a cada composto.
  
- As topoisomerasas constituem um excelente alvo quimioterápico em tripanosomatídeos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1442-1443, 2004.

BAKSHI, R.P. & SHAPIRO, T.A. RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential. *Mol & Biochem Parasitol*, 136: 249-255, 2004.

BALAÑA-FOUCE, R.; REDONDO, C.M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; DÍAZ-GONZÁLEZ, R.; REGUERA, R. Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I. *Drug Discov Today*, 11: 733-740, 2006.

BALIGA, R. & CROTHERS, D.M. On the kinetics of distamycin binding to its target sites on duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 97: 7814-7818, 2000.

BERNARDI, A. JACQUES-SILVA, M.C.; DELGADO-CANEDO, A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A.M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. *Eur J. Pharmacol*, 532: 214-22, 2006.

BODLEY, A.L. & SHAPIRO, T.A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92: 3726-3730, 1995.

BODLEY, A.L.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; SHAPIRO, T.A. Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs structure-activity correlations. *Biochim. Pharmacology*, 50: 937-942, 1995.

BRACK, C.H.; DELAIN, E.; RIOU, G. Replicating, covalently, closed, circular DNA from kinetoplasts of *T. cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 69: 1642-1646, 1972.

CAVALCANTI, D.P.; FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M.C.M. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. *Parasitol. Research*, 94: 439-448, 2004.

CAVALCANTI, D.P. & DE SOUZA, W. DNA containing organelles in pathogenic protozoa. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 2: 89-104, 2007.

CAVALCANTI, D.P.; THIRY, M.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M.C.M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-

etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. *Histochem. Cell Biology*, 130: 1177-1185, 2008.

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

CHAMPOUX, J.J. DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem*, 70: 369-413, 2001.

CORTÁZAR, T.M.; COOMBS, G.H.; WALKER, J. *Leishmania panamensis*: Comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. *Exp Parasitol*, 116: 475-482, 2007.

COURA, J.R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

DAS, A.; DASGUPTA, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H.K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol*, 20: 381-386, 2004.

DAS, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H.K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? *Mol Microbiol*, 62: 1-11, 2006.

DAS, A.; GANGULY, A.; MAJUMDER, H.K. DNA topoisomerases of *Leishmania*: the potencial targets for anti-leishmanial therapy. *Drugs targets in Kinetoplastid Parasites*, 625: 103-115, 2008.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol*, 86: 197-283, 1984.

DE SOUZA, W.; CARREIRO, I. P.; MIRANDA, K.; CUNHA E SILVA, N.L. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Ci*, 72: 421-432, 2000.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, 8: 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes – A historical view. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103: 313-325, 2008.

DE CLERQ, E & DANN, O. Diarylamidine derivates as oncornaviral DNA inhibitors. *J Med Chem*, 23: 787-795, 1980.

DELAIN, E.; BRACK, C.; RIOU, G.; FESTY, B. Ultrastructural alterations of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast induced by the interaction of a trypanocidal drug (hydroxystilbamidine) with the kinetoplast DNA. *J Ultrastruct Res*, 37: 200-218, 1971.

DESAI, S. D.; LI, T.K.; RODRIGUEZ-BAUMAN, A.; RUBIN, E.H.; LIU, L.F. Ubiquitin/ 26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Research*, 61: 5926-5932, 2001.

DETERDING, A.; DUNGEY, F.A.; THOMPSON, K.; STEVERDING, D. Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. *Acta Tropica*, 93: 311-316, 2005.

DIÁZ-GONZÁLEZ, R.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; PRADA, C.F.; FERNÁNDEZ-RUBIO, C.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M. Novel findings on trypanosomatid chemotherapy using DNA topoisomerase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*, 9: 674-686, 2009.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S.N.J. Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*, 3: 251-261, 2005.

EGBE-NWIYI, T.N.; IGBOKWE, I.O.; ONYEYILI, P.A. The pathogenicity of diminazene aceturate-resistant *T. brucei* in rats after treatment with the drug. *Journal Comp. Path*, 128: 188-191, 2003.

EGBE-NWIYI, T.N.; IGBOKWE, I.O.; ONYEYILI, P.A. Diminazene aceturate resistance on the virulence of *T. brucei* for rats. *Journal Comp. Path*, 133: 286-288, 2005.

ELIAS, M.C.; CUNHA, J.P.C.; FARIA, F.P.; MORTARA, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Morphological events during the *T. cruzi* cell cycle. *Protist*, 158: 147-157, 2007.

ELIAS, M.C.Q.B.; FARIA, M.; MORTARA, R.A.; MOTTA, M.C.M.; DE SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. *Eukaryotic Cell*, 1: 944-953, 2002.

FACOMPRÉ, M.; BALDEYROU, B.; BAILLY, C.; ANIZON, F.; MARMINON, C.; PRUDHOMME, M.; COLSON, P.; HOUSIER, C. DNA targeting of two new antitumour rebeccamycin derivatives. *Eur J Med Chem*, 37: 925-932, 2002.

FORTUNE, J.M.; OSHEROFF, N. Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II $\alpha$  by blocking DNA cleavage. *J Biol Chem*, 273: 17643-17650, 1998.

FRAGOSO, S.P. & GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. *Mol Biochem Parasitol*, 55: 127-134, 1990.

FREYMULLER, E. & CAMARGO, E.P. Ultrastructural differences between species of tripanosomatids with and without endosymbionts. *J. Protozool*, 28: 175-182, 1981.

GONZALES-PERDOMO, M.; CASTRO, S.L.; MEIRELLES, M.N.S.L.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 1707-1714, 1990.

GONZÁLEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J.M. The Formation of DNA Interstrand Cross-Links by a Novel Bis [Pt2Cl4(diminazene acetate)2]Cl4z4H2O Complex Inhibits the B to Z Transition. *Mol Pharmacol*, 55: 770-777, 1999.

GRAMS, J.; MORRIS, J.C.; DREW, M.E.; WANG, Z.; ENGLUND, P.T.; HAJDUK, S.L. A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. *J. Biol. Chem*, 277: 16952-16959, 2002.

HANDE, K.R.; Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34: 1514-1521, 1998.

HEYWOOD, P & WEINMAN, D. Mitosis in the hemoflagellate *Trypanosoma cyclops*. *Protozool*, 25: 287-292, 1978.

HSIANG, Y.H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S.; LIU, L.F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 260: 14873-14878, 1985.

HSIANG, Y.H.; LIHOU, M.G.; LIU, L.F. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Resaerch*, 49: 5077-5082, 1989.

HOEIJMAKERS, J.H.J. & WEIJERS, P.J. The segregation of kinetoplast DNA networks in *Trypanosoma brucei*. *Plasmid*, 4: 97-116, 1980.

KANG, D. H.; KIM, J.S.; JUNG,M.J.; LEE, E.S.; JAHNG, Y.; KWON, Y.; NA, Y. New insight for fluoroquinophenoxazine derivatives as possibly new potent topoisomerase I inhibitor. *Bioorg Med Chem*, 18: 1520-1524, 2008.

LACOMBLE, S.; VAUGHAN, S.; GADELHA, C.; MORPHEW M.K.; SHAW, M.K.; MCINTOSH, J.R.; GULL, .K. Three-dimensional cellular architerture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *J Cell Science*, 8: 1081-1090, 2008.

LARSEN, A.K.; ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 99: 167-181, 2003.

LEWIN, B. Genes VII- cap. 14, p. 412- 417. Artmed Editora. Porto Alegre- RS, Brasil, 2001.

LI, Z.; LINDSAY, M.E.; MOTYKA, S.A.; ENGLUND, P.T.; WANG, C.C. Identification of a bacterial-like HslVU protease in the mitochondria of *Trypanosoma brucei* and its role in mitochondrial DNA replication. *PLoS Pathog*, 18: 2008.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S.A.; AGBO, E.E.C.; ENGLUND, P.T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol*, 21: 363-9, 2005.

LIU, B.; WANG, J.; YAFFE, N.; LINDSAY, M.E.; ZHAO, Z.; ZICK, A.; SHLOMAI, J.; ENGLUND, P.T. Trypanosomes have six mitochondrial DNA helicases with one controlling kinetoplast maxicircle replication. *Mol Cell*, 35: 490-501, 2009.

MOTTA, .M.C.M.; DE SOUZA, W.; THIRY, M. Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. *Microbiol Letters*, 221: 17-23, 2003.

MOTTA, M.C.M. Kinetoplast as a potential chemotherapy target of trypanosomatids. *Curr Pharm Des*, 14: 847-54, 2008.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P; PENA, S.D.J. Chagas' Disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*, 4: 1-16, 2002.

MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 54: 1861-1875, 2004.

MORRIS, J.C.; DREW, M.E.; KLINGBEIL, M.M.; MOTYKA, S.A.; SAXOWSKY, T.T.; WANG, Z.; ENGLUND, P.T. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int J Parasitol*, 31: 453-458, 2001.

MUKHERJEE, A.; LAVERY, R.; BAGCHI, B.; HYNES, J.T. On the molecular mechanism of drug intercalation into DNA: a simulation study of the intercalation pathway, free energy, and DNA structural changes. *J Am Chem Soc*, 130: 9747-9755, 2008.

NARDELLI, S.C.; DA CUNHA, J.P.C.; MOTTA, M.C.M.; SCHENKMAN, S. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. *Chromosoma*, 118: 487-499, 2009.

NENORTAS, E.; BURRI, C.; SHAPITO, T.A. Antitrypanosomal activity of fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2066-2068, 1999.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*, 11ª edição, editora Atheneu, 2005.

OGBADOYI, E; ERSFELD, K.; ROBINSON, D.; SHERWIN, T.; GULL, K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, 108: 501-513, 2000.

OTAKE, Y.; MIMS, A.; FERNANDES, D.J. Merbarone Induces Activation of Caspase-Activated DNase and Excision of Chromosomal DNA Loops from the Nuclear Matrix. *Mol Pharmacol*, 69: 1477-1485, 2006.

PALCHAUDHURI, R. & HERGENROTHER, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin in Biotechnol*, 18: 497-503, 2007.

PEREGRINE, A.S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. *Acta Trop*, 54: 185-203, 1993.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*, 6: 789-802, 2006.

PORTUGAL, J. Berenil acts as a poison of eukaryotic topoisomerase II. *FEBS lett*, 344: 136-138, 1994.

RANISE, A.; SPALLAROSSA, A.; SCHENONE, S.; BRUNO, O.; BONDAVALLI, F.; PANI, A.; MARONGIU, M.E.; MASCIA, V.; LA COLLA, P.; LODDO, R. Synthesis and antiproliferative activity of basic thioanalogues of merbarone. *Bioorg Med Chem*, 11: 2575-2589, 2003.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*, 2ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 2002.

RIOU, G.F.; GABILLOT, M.; DOUC-RASY, S.; KAYSER, A.; BARROIS, M. A type I DNA topoisomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J Biochem*, 134: 479-484, 1983.

RODRIGUEZ-BURFORD, C; BARNES, M.N.; OELSCHLAGER, D.K.; MYERS, R.B.; TALLEY, L.I.; PARTRIDGE, E.E.; GRIZZLE, W.E. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) on ovarian carcinoma cell lines: Preclinical evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. *Clin Cancer Res*, 8: 202-9, 2002.

SÁNCHEZ, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis and biological activity. *Nat Prod Rep*, 23: 1007-1045, 2006.

SCHAEFFER, A.J.; The expanding role of fluoroquinolones. *Dis Mom*, 49: 45-54, 2002.

SEN, N.; DAS, B.B.; GANGULY, A.; MUKHERJEE, T.; TRIPATHI, G.; BANDGYOPADHYAY, S.; RAKSHIT, S.; SEN, T.; MAJUMDER, H.K. Camptothecin induced

mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *L. donovani*. *Cell Death Differ*, 11: 924-936, 2004a.

SEN, N.; DAS, B.B.; GANGULY, A.; MUKHERJEE, T.; BANDGYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H.K. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *L. donovani*. *J. Biol. Chem.*, 279: 52366-52375, 2004b.

SEN, N. & MAJUMDER, H.K. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. *Cur.Pharm. Des.* 14: 839-846, 2008.

SHAPIRO, T.A & ENGLUND, P.T. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 87: 950-954, 1990.

SHAPIRO, T.A. & ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Ann. Rev. Microbiol*, 49: 117-143, 1995.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp Parasitol*, 72: 76-86, 1991.

SCOCCA, J.R. & SHAPIRO, T.A. A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. *Mol Microbiol*, 67: 820-829, 2008.

SOLARI, A.J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma*, 78: 239-255, 1980.

STOCKERT, J.C.; TRIGOSO, C.I.; CUÉLLAR, T.; BELLA, J.L.; LISANTI, J.A. A new fluorescence reaction in DNA cytochemistry: microscopic and spectroscopic studies on the aromatic diamidino compound M&B 938. *J. Histochem.Cytochem.*, 45: 97-105, 1997.

TEICHER, B.A. Next generation topoisomerase I inhibitors: rationale and biomarker strategies. *Bioche. Pharmacol.*, 75: 1626-1271, 2008.

THIRY, M. Nucleic acid compartmentalization within the cell nucleus by in situ transferase-immunogold techniques. *Microsc.Res. Tech.*, 31: 4-21, 1995.

TIDWELL, R.R.; JONES, S.K.; GERATZ, D.; OHEMENG, K.A.; CORY, M.; HALL, J.E. Analogues of 1,5-bis(4-amidinophenoxy)pentane (Pentamidine) in the treatment of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Med. Chem.*, 33: 1252–1257, 1990.

TSAO, Y.P.; D'ARPA, P.; LIU, L.F. The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest: altered regulation of p<sup>34cdc2</sup>/cyclin B. *Cancer Res.*, 52: 1823-1829, 1992.

TSE, Y.C.; KIRKEGAARD, K.; WANG, J.C. Covalent bonds between protein and DNA. Formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA. *J. Biol. Chem.*, 255: 5560-5565, 1980.

WERBOVETZ, K.A.; BHATTACHARJEE, A.K.; BRENDLE, J.J.; SCOVILL, J.P. Analysis of stereoelectronic properties of camptothecin analogues in relation to biological activity. *Bioor. Med. Chem.*, 8: 1741-1747, 2000.

WITOLA, W.H.; ATSUDA, A.; INOUE, N.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Acquired resistance to Berenil in a cloned isolate of *T. evansi* is associated with upregulation of a novel gene, TeDR40. *Parasitol.*, 131: 635-646, 2005.

WOODWARD, R. & GULL, K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 95: 49-57, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' Disease. Geneva: World Health Organization, 2002 (Technical Report Series, 905).

ZHANG, B.; ZHANG, A.; CHEN, L.; GUANG, X.X. Inhibition of DNA helicase, ATPase and DNA-binding activities of *E. coli* RecQ helicase by chemotherapeutic agents. *J. Biochem.*, 143: 773-779, 2008.

# 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](#)