

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

THIAGO MANCHESTER DE MELLO

**EFEITOS DA ACRIFLAVINA NA PROLIFERAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
CONSUMO DE O₂ EM EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E
*BLASTOCRITHIDIA CULICIS***

Rio de Janeiro
2010

Thiago Manchester de Mello

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Efeitos da acriflavina na proliferação, ultraestrutura e consumo de O₂ em epimastigotas
de *Trypanosoma cruzi* e *Blastocrithidia culicis*

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

Ficha catalográfica:

Manchester, Thiago

Efeitos da acriflavina na proliferação, ultraestrutura e consumo de O₂ em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Blastocrithidia culicis* /Thiago Manchester de Mello. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. 2007.

120f.

Orientador: Dra. Maria Cristina Machado Motta.

Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

Bibliografia: f. 92-103.

1. Acriflavina 2. Cinetoplasto 3. kDNA 4. Ultraestrutura 5. Tripanosomatídeos

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

II. Efeitos da acriflavina na proliferação, ultraestrutura e consumo de O₂ em tripanosomatídeos

THIAGO MANCHESTER DE MELLO

EFEITOS DA ACRIFLAVINA NA PROLIFERAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
CONSUMO EM O₂ DE TRIPANOSOMATÍDEOS

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

Dr. André Luis Souza dos Santos

Dr. Norton Heise

Dra. Sonia Rozental

Dra. Maria Cristina Machado Motta (orientadora)

Dra. Thais Cristina Baeta Soares Souto Padron

Rio de Janeiro
2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial aos meus pais por prover meus valores, meu caráter, minha educação e por sempre abrir as minhas portas para os estudos.

Em especial ao meu irmão André, pela eterna torcida pelo meu sucesso, por acreditar em mim e pela sua constante presença na minha vida.

Agradeço em especial a Cristina Motta, orientadora, conselheira, motivadora e responsável por toda a minha formação profissional. O único ser no universo capaz de me orientar por todos esses anos! Muito obrigado por ter acreditado em meu potencial.

Em especial a Danielle Cavalcanti, amiga, conselheira, puxadora de minhas orelhas, pessoa e profissional que tenho grande admiração. Não teria chegado aqui sem você!

Ao professor Wanderley de Souza por ser o “chefinho” que está sempre cobrando resultados e ser um grande estimulador para cada um de nós do laboratório.

Aos professores Márcia Attias e Kildare por terem estimulado meus conhecimentos com a microscopia eletrônica e terem ajudado muito a formar o microscopista que sou hoje.

Às professoras Rossiane e Técia pelo carinho e respeito apesar de todas as brincadeiras e momentos de discussões laboratoriais.

Às professoras Narcisa e Juliany pelo sempre presente auxílio tanto em questões de bancada, dúvidas, momentos desesperadores...

Em especial a Ana Cristina Dore, uma grande amiga a qual tenho um grande carinho e admiração. Foram muitas as conversas, apoio e estímulo nos momentos que mais precisei. Muito obrigado!

Em especial a Marlene Cazuza por todo o carinho e o auxílio.

Em especial a Luzinete pelo bom humor e carinho comigo. Exemplo de perseverança e peça indispensável no pleno funcionamento do laboratório.

Em especial a Noêmia, pela paciência e ensinamentos com a microscopia eletrônica e também pela convivência e a sempre disponibilidade de me ajudar.

Em especial ao eterno amigo Antonio Bosco, um grande exemplo de profissional e de pessoa, pelo bom humor, carinho, amizade por todos os anos que convivemos juntos.

À Rachel, nova técnica da microscopia.

Ao Deda pelos auxílios técnicos e a amizade.

À Madalena pelo bom humor e a ajuda no microscópio confocal do Inmetro.

Aos camaradas que já passaram pelo LUCHM, mas deixam saudades. Raison, Tatiane e Renata, obrigado!

À Sandrinha e a Gabriela pela ajuda com todas as coisas burocráticas e administrativas do Instituto.

Ao Senhor Gentil, Sérgio e ao Valdir pelo excelente bom humor e a prestatividade de ajudar sempre que foi necessário.

À professora Elvira Saraiva pela ótima convivência e bom humor e sempre auxiliar em minhas dúvidas e necessidades de laboratório. Também fica o agradecimento aos seus alunos Michelle e Deivid por toda ajuda em todos esses anos.

À professora Thais Souto-Padrón por todos os auxílios de todas as espécies, pelas ótimas conversas e a presença sempre constante no LUCHM. Também agradeço a todos os seus alunos que sempre foram muito solícitos comigo: Roberta, Camila e Moara.

Ao professor Antonio Galina pela colaboração e atenção aos ensinamentos. Assim como seu alunos Juliana e Vagner pela ajuda sempre que precisei.

À professora Rosane Silva pela colaboração, carinho e bom humor. Em especial agradeço à Cíntia pela amizade de todos esses anos e toda ajuda que me deu no LMMFTC. Também agradeço à Vanessa, Ernesto, Deivid, Bill e a todos do LMMFTC que me ajudaram bastante.

Ao professor Turán pelas boas discussões sobre biologia molecular e seus ensinamentos.

À professora Sônia Rozental pela amizade, conversas e convívio. Também às suas alunas Carol Guerra, Amanda, Taíssa, Luana e Kelly Ishida por todo o carinho e ajuda em momentos que precisei.

Ao professor Ronaldo Mohanna pela boa convivência assim como dos alunos de seu laboratório: Diego, Renata, Chico, Marcela, Emiliana e outros mais.

Ao professor Inácio Neto pela amizade, atenção e por sempre disponibilizar os recursos do seu laboratório. Agradeço também aos seus alunos Roberto, Thiago e ao Orlando pela ajuda.

Aos professores Marcelo Lamas, Ednildo, Norton Heise, Ricardo Louro, Gilberto Weissmuller pela amizade.

Ao professor Fernando Costa e Silva pelas aulas de Bio Geral e da pós e também por outros auxílios.

À Marlene Benchimol pelas ótimas aulas na pós-graduação.

Às alunas do Laboratório de Neurobiologia pela ajuda e disponibilidade dos microscópios óticos: Suellen, Michele e Andréia.

À Cristina Henriques pela grande amizade, carinho e por ser esse grande exemplo de seriedade e dedicação.

Ao Celso Sant'anna por sempre estar disponível ajudar e aos bons momentos de convivência no laboratório.

À Loraine e o Leonardo Andrade pela amizade e ensinamentos que foram muito importantes em minha formação.

À Miria pela amizade e nossas eternas discussões sobre literatura não-científica.

À Érica pela amizade por todos esses anos e todas as vezes que me ajudou.

Ao Leandro também pela amizade, os momentos de descontração e a constante disponibilidade para ajudar.

À Emile pela ótima convivência e todas as vezes que me ajudou com a microscopia ótica.

Ao Gustavo por ser chato, mas sempre ter alguma coisa para ajudar.

Ao Lorian, Wendell, Fábio, Renata, Ana Paula, Juliana Vidal, Carol, Sílvia, Tatiana, Gabriela, Mariana, Phercyles, Joseane, Bruno, Elaine, Elvis, Lia, Camila, Sara e Renata Aloise pelo convívio no LUCHM por esses anos.

E aos que não mais estão, mas deixaram suas contribuições e saudades: Bruno, Mariana, Letícia, Juliana Dutra, André Jeovânio, Ana Cláudia, João Gabriel, Mariana Garcia, Mateus, Lucas, Amandinha, Roberta, Monalisa, Sara, Mariana Hammes, Lívia, Diorney e Gisele.

Aos “falcatruas” Thiago Luiz “Cirilo”, Rodrigo Godinho e o Márcio por todos esses anos de camaradagem desde a época da graduação.

À Iara por toda a tagarelice e amizade.

À Karlinha pela amizade de todos esses anos.

Ao Miguel por ser mala, mas ser um ótimo amigo.

Ao Thiago e a Lissa, casal mais brega que eu conheço e que tanto amo também! Muito obrigado por tudo, meus amigos!

Aos Crithídios que não estão mais conosco: Pati, Adriana, Aliny, Geziel, Luisa, Jaque, Desirée, Stephanie e Marina.

À Patrícia, que acabou de chegar, mas já é uma Crithídia.

À Thaiana por ser fofa e divertida do seu jeitinho. Obrigado pela amizade.

À Joyle por aturar as minhas zoações e pela amizade.

À Silvana pelo bom humor e pelo carinho. Muito obrigado.

Em especial à Claudinha Maia, amiga, afilhada, confidente, conselheira, motivadora e pessoa de grande importância na minha vida. Amo muito a amizade que cultivamos por esses anos.

Em especial à Iamara, “filha” e grande amiga. A amizade especial que criamos ao longo desses anos foi muito importante pra mim. Obrigado por tudo. Agradeço também ao Rafael pela amizade.

Em especial a Carol Catta Preta por essa linda amizade que temos, pelas confidências e presença necessária em minha vida. Obrigado pelo carinho e apoio.

Em especial ao Allan e Felipe pela amizade sincera que temos dentro e fora de laboratório. Por todos os momentos de descontração, ajuda e apoio que temos juntos.

Em especial ao Paulo Roberto pelo grande exemplo de pessoa que é e pela amizade que considero muito.

Em especial a Daniela Lourenço pela amizade e carinho que sinto por ela.

Em especial a Aline Zuma por ser a pessoa maravilhosa que é, doce, carinhosa, atenciosa e estar sempre pronta a ajudar. Muito obrigado pela sua amizade e por todo o carinho que tem por mim. Te adoro!

Em especial aos meus amigos-irmãos Diego e José pela amizade de longa data, o apoio, o companheirismo e tudo mais! Muito obrigado, meus amigos!

E a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta no desenvolvimento desta dissertação. A todos que eu bati na porta de seu laboratório para pedir um reagente e nem sequer sei o nome... Sintam-se todos agradecidos.

Resumo

A família Trypanosomatidae compreende protozoários flagelados, que apresentam uma estrutura típica, o cinetoplasto, que contém o DNA mitocondrial (kDNA) organizado em círculos catenados. Esta organização única da rede de kDNA e a susceptibilidade do cinetoplasto a uma grande variedade de compostos, torna esta estrutura um potencial alvo quimioterápico. O kDNA apresenta diferentes arranjos que variam de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento, sendo também modificado pela presença de uma bactéria simbiótica. Neste trabalho, nós analisamos os efeitos da acriflavina, um agente intercalante de DNA, no crescimento celular, na ultraestrutura do cinetoplasto e no consumo de O₂ da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* e de *Blastocrithidia culicis*. Estas espécies foram escolhidas por apresentarem diferentes arranjos da rede de kDNA. Para analisar o efeito da acriflavina na proliferação celular, os protozoários foram cultivados com diferentes concentrações da droga (1 a 50 µg/ml). Considerando o tempo de geração dos tripanosomatídeos, após cada 12 ou 24 horas, parte da cultura era removida para contagem de células, para o processamento por microscopia eletrônica de transmissão ou para medidas do consumo de O₂. Nossos resultados mostraram que a acriflavina promove uma inibição da proliferação celular de maneira dose-dependente, além de gerar protozoários discinetopláticos em ambas as espécies. Análises ultraestruturais mostraram que o tratamento com acriflavina promove uma drástica modificação do cinetoplasto, que apresentou mudanças na distribuição e na compactação do kDNA. Abordagens citoquímicas pela técnica do ácido fosfotúngstico (PTA) e pelo método da prata amoniacal sugeriram que o tratamento com acriflavina promove a redistribuição de proteínas básicas no cinetoplasto. A coloração de cortes finos com acetato de uranila, assim como, o uso do método de imunomarcagem da terminal deoxinucleotidil transferase (TdT), que reconhecem sítios contendo ácidos nucléicos, reforçaram a idéia de que protozoários tratados com acriflavina sofrem rearranjo do kDNA. Análises bioquímicas demonstraram a capacidade da acriflavina de diminuir a taxa de consumo de O₂ dos tripanosomatídeos. Juntos, estes dados reafirmam o cinetoplasto como um potencial alvo quimioterápico e indicam que a acriflavina é uma valiosa ferramenta para estudar o arranjo e a replicação do kDNA.

Abstract

The Trypanosomatidae family comprises flagellated protozoa which present a typical structure, the kinetoplast, which contains the mitochondrial DNA (kDNA) arranged in catenated circles. This unique organization of the kDNA network and the susceptibility of the kinetoplast to a great variety of compounds, make this structure a potential target to chemotherapy. The kDNA presents different arrangements that vary according to species and stage of development, being also modified by the presence of a symbiotic bacterium. In this work, we analysed the effects of acriflavine, a DNA intercalating agent, on cell growth, kinetoplast ultrastructure and O₂ consumption of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and *Blastocrithidia culicis*. These species were chosen for presenting different kDNA network arrangement. In order to analyze the effect of acriflavine on cell proliferation, protozoa were cultivated with different drug concentrations (1 to 50 µg/ml). Considering the trypanosomatid generation time, after each 12 or 24 hours, part of the culture was removed for cell counting, for processing to transmission electron microscopy or for measurements of O₂ consumption. Our results showed that acriflavine promoted a dose-dependent inhibitory effect on the cell proliferation and generated dyskinetoplastic protozoa on both species. Ultrastructural analysis showed that the acriflavine treatment promoted a drastic modification in the kinetoplast, which changed kDNA distribution and packaging. Cytochemistry approaches, as the phosphotungstic acid (PTA) technique and the amoniactal silver method, suggest that acriflavin treatment promotes the redistribution of basic proteins in the kinetoplast. Staining of thin section with uranyl acetate, as well as, the use of the terminal deoxynucleotidil transferase immunogold (TdT) method, which recognize sites containing nucleic acids, reinforced the idea that protozoa treated with acriflavin suffer kDNA rearrangement. Biochemical analysis demonstrated the acriflavine capacity to decrease the protozoa O₂ rate consumption on trypanosomatids. Taken together, these data reaffirm the kinetoplast as a potential chemotherapeutic target and indicate that the acriflavin is a valuable tool to study kDNA arrangement and replication.

Lista de abreviaturas

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ATP: Adenosina Tri Fosfato

BrdU: 5'-bromo-2'-deoxiuridina

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

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

KAPs: Kinetoplast Associated Proteins (Proteínas Associadas ao Cinetoplasto)

kDNA: DNA do cinetoplasto

KFZ: Kinetoflagelar zone (Zona cineto-flagelar)

LIT: Liver Infusion Tryptose

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

PBS: Phosphate Buffered Saline (solução salina tamponada)

PTA: Phosphotungstic Acid (Ácido fosfotúngstico)

RNA: Ácido Ribonucléico

TAC: Tripartite Attachment Complex (Complexo de Ligação Tripartite)

UMS: Universal Minicircle Sequence (Sequencia Universal de Minicírculos)

UMSBP: Universal Minicircle Sequence Binding Protein (proteínas que se ligam a seqüência universal de minicírculos)

TdT: Terminal desoxinucleotidil transferase

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

Lista de figuras

Figura 1: Desenho esquemático do ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	21
Figura 2: Representação esquemática da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	25
Figura 3: A mitocôndria de tripanosomatídeos	29
Figura 4: Desenho esquemático da organização da rede de k-DNA em tripanosomatídeos	31
Figura 5: Rede de kDNA de <i>C. fasciculata</i>	31
Figura 6: Diferentes formatos do cinetoplasto e variações nos arranjos da rede de kDNA nos tripanosomatídeos	32
Figura 7: Diagrama esquemático do complexo de ligação tripartite (TAC)	34
Figura 8: Desenho esquemático mostrando o processo replicativo dos minicírculos	35
Figura 9: Desenho esquemático do processo de replicação da rede de kDNA em tripanosomatídeos	36
Figura 10: Micrografia eletrônica de um maxicírculo de <i>T. brucei</i> .	37
Figura 11: Representação esquemática do processo de replicação da rede de kDNA e onde atuam os diversos compostos conhecidos como inibidores de topoisomerasas	41
Figura 12: Exemplo de compostos ligantes ao DNA	43
Figura 13: Daunomicina	44
Figura 14: Fórmula química do berenil	45
Figura 15: Exemplos de compostos intercalantes típicos e atípicos e compostos que se ligam à cavidade menor da molécula de DNA	47
Figura 16: Compostos formadores da acriflavina e suas respectivas fórmulas estruturais	48
Figura 17: Acriflavina em pó vendida pela Drag Pharma (Chile)	49

Figura 18: Acriflavina vendida pela empresa Kordon (Estados Unidos)	49
Figura 19: Curva de proliferação celular de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	65
Figura 20: Curva de proliferação celular de <i>B. culicis</i>	66
Figura 21: Ultraestrutura celular observada por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados ou não tratados (controle) com baixa concentração de acriflavina.	68
Figura 22: Epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com concentrações elevadas de acriflavina.	69
Figura 23: Ultraestrutura celular observada por microscopia eletrônica de transmissão de <i>B. culicis</i> tratada ou não tratada (controle) com baixa concentração de acriflavina.	71
Figura 24: Ultraestrutura de <i>B. culicis</i> tratada com concentrações elevadas de acriflavina.	72
Figura 25 - Técnica de detecção de proteínas básicas ricas em arginina e lisina utilizando a técnica do PTA em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	74
Figura 26 - Técnica de detecção de proteínas básicas ricas em histidina, utilizando a técnica da prata amoniacal em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	76
Figura 27: Citoquímica ultraestrutural utilizando uranila 0,42% para a detecção de ácidos nucléicos.	77
Figura 28: Citoquímica ultraestrutural utilizando a técnica do TdT, que é específica para a detecção de DNA.	79
Figura 29: Técnica do Panótico Rápido observada por microscopia óptica de campo claro aplicada em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	81
Figura 30: Quantificação de células discinetoplásticas após o tratamento com acriflavina 5 e 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 24h.	82
Figura 31: Epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos a tratamento mais longo com 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de acriflavina.	84
Figura 32: Curva de proliferação celular de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos ao longo tratamento com acriflavina por até 192h	85
Figura 33: Porcentagem de células discinetoplásticas em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos ao tratamento mais longo com acriflavina.	86

Figura 34: Consumo de oxigênio de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> testado em células controle ou tratadas com 5,10, 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de acriflavina por 24 h.	88
Figura 35: Percentual de inibição do consumo de oxigênio de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> considerando cada concentração de droga utilizada em relação ao consumo de células não tratadas.	88
Figura 36: Consumo de oxigênio de <i>B. culicis</i> controle e tratado com 5,10, 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de acriflavina por 24 horas.	89
Figura 37: Inibição do consumo de oxigênio de <i>B. culicis</i> para cada concentração de droga utilizada em relação ao consumo de células não tratadas.	89

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tripanosomatídeos que possuem bactéria simbiótica e seus respectivos hospedeiros	24
Tabela 2: Função das proteínas envolvidas no processo de replicação do kDNA	36
Tabela 3: Classificação dos inibidores de DNA topoisomerases e seus respectivos alvos	42
Tabela 4: Discinetoplastia em tripanosomatídeos mencionada por ordem cronológica da descrição	50
Tabela 5: Resumo cronológico do experimento de sobrevivência	57
Tabela 6: Efeitos da acriflavina na ultraestrutura de <i>T. cruzi</i>	86

Sumário

1	Introdução	19
1.1	Tripanosomatídeos	20
1.1.1	Aspectos gerais	20
1.1.2	Ciclo de vida dos tripanosomatídeos	21
1.1.3	Endossimbiose em tripanosomatídeos	23
1.1.4	Características morfológicas dos tripanosomatídeos	25
1.2	O cinetoplasto: estrutura e mecanismo de divisão	30
1.3	Quimioterapia na doença de Chagas	37
1.3.1	O Cinetoplasto como alvo quimioterápico	39
1.4	Drogas ligantes do DNA	43
1.4.1	Drogas que se ligam à cavidade menor do DNA	44
1.4.2	Agentes intercalantes	46
1.4.3	Acriflavina	47
2	Racional	52
3	Objetivos	55
3.1	Objetivo geral	56
3.2	Objetivos específicos	56
4	Material e métodos	57
4.1	Cultivo celular	58
4.2	Curvas de crescimento: ação da acriflavina na proliferação celular	58
4.3	Longo cultivo em presença de acriflavina	60
4.4	Avaliação da viabilidade celular	60

4.5	Quantificação de células discinetoplásticas utilizando o método do Panótico Rápido	60
4.6	Microscopia eletrônica de transmissão	61
4.6.1	Preparação de rotina	61
4.6.2	Citoquímica ultraestrutural	61
3.6.3.	Imunocitoquímica Ultraestrutural para a detecção de DNA	63
4.7	Consumo de O ₂	64
4.8	Análises gráficas e estatísticas	65
5	Resultados	66
5.1	Proliferação celular	67
5.2	Microscopia eletrônica de transmissão de rotina	68
5.3	Citoquímica ultraestrutural	76
5.3.1	Detecção de proteínas básicas utilizando a técnica do PTA	76
5.3.2	Detecção de proteínas básicas utilizando a técnica da prata amoniacal	77
5.3.3	Detecção de ácidos nucleicos utilizando acetato de uranila 0,42%	79
5.3.4	Detecção de DNA utilizando a técnica do TdT	80
5.4	Técnica do Panótico Rápido observada por microscopia óptica de campo claro	82
5.5	Quantificação de protozoários discinetoplásticos em culturas tratadas com acriflavina	84
5.6	Análise da ultraestrutura e proliferação de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidos ao longo tratamento com acriflavina	85
5.7	Quantificação de células discinetoplásticas do experimento de sobrevivência em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	87

5.8	Medição do consumo de oxigênio	89
6	Discussão	92
7	Conclusões	103
8	Referências	105

1 Introdução

**“A imaginação é mais importante que o
conhecimento.”**

Albert Einstein

1.1 Tripanosomatídeos

1.1.1 Aspectos gerais

Os Protistas são representado pelos protozoários, que são considerados os eucariotos mais primitivos. Os protozoários da ordem Kinetoplastida são caracterizados pela presença de uma estrutura ímpar na natureza, o cinetoplasto, que abriga o DNA mitocondrial destes organismos. Entre os cinetoplastídeos estão os protistas de vida livre, assim como os parasitas de insetos, de plantas e de vertebrados. Entretanto, a família Trypanosomatidae, que compõem esta ordem, é constituída somente por protozoários parasitas, seja de plantas, vertebrados ou invertebrados (Simpson *et al.*, 2006).

Muitos tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, protozoários do gênero *Leishmania* e *Phytomonas* despertam grande interesse econômico, médico, veterinário e agrícola por causarem doenças ao homem, a animais e a plantas. Podemos destacar, entre essas espécies, o *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas e protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, que causam os diversos tipos de leishmanioses (WHO, 2010). Tais protozoários patogênicos desta família são heteroxênicos, pois necessitam de um hospedeiro invertebrado, geralmente um inseto vetor e de um hospedeiro vertebrado para completar seu ciclo de vida (Vickerman, 1985). No entanto, a maioria dos protozoários desta família é dita monoxênica, ou seja, coloniza um único hospedeiro invertebrado, geralmente um inseto, ao longo de todo o seu ciclo de vida (Wallace, 1966; Podlipaev & Rokitskaya, 1999). Além disso, uma característica exclusiva de algumas espécies monoxênicas é a presença de uma bactéria simbiótica no citoplasma. Este endossimbionte apresenta uma relação mutualística com o tripanosomatídeo

hospedeiro, constituindo um excelente modelo para o estudo da origem simbiótica de organelas e da evolução da célula eucariota (De Souza & Motta, 1999).

1.1.2 Ciclo de vida dos tripanosomatídeos

Os protozoários que são parasitas, como os tripanosomatídeos, precisam completar ciclos biológicos, muitas vezes complexos, para garantir sua replicação e sobrevivência. Os tripanosomatídeos que necessitam de um hospedeiro vertebrado para fechar seus ciclos biológicos são aqueles que apresentam maior importância médica e veterinária.

O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve três formas evolutivas diferentes e dois hospedeiros: um vertebrado e outro invertebrado (Fig. 1). As formas epimastigotas replicativas do *T. cruzi*, que se encontram no intestino do inseto vetor, aderem à sua superfície, se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese), formas não proliferativas capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. Durante o repasto alimentar do inseto, os tripomastigotas metacíclicos são eliminados junto com as fezes e urina e podem penetrar através das mucosas, das conjuntivas ou de qualquer lesão presente na pele do vertebrado. Na região onde se deu a penetração, os tripomastigotas são fagocitados pelos macrófagos e permanecem no interior do vacúolo parasitóforo, até que conseguem romper sua membrana para chegar ao citoplasma da célula infectada, onde se transformam em amastigotas. Após sucessivas divisões no citoplasma, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e as células hospedeiras se rompem, liberando os parasitas na corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneos). Alguns parasitas invadem

novas células da vizinhança, enquanto outros são disseminados pela corrente sanguínea, indo colonizar diversos órgãos e tecidos, repetindo assim o ciclo intracelular. Eventualmente, os triatomíneos se alimentam do sangue de um animal infectado e ingerem tripomastigotas sanguíneos, que se transformam novamente em epimastigotas replicativos no intestino do inseto, fechando assim o ciclo de vida do protozoário. No entanto, a contaminação por transmissão congênita, via oral ou por transfusões de sangue, pode ocorrer, porém são mais raras (revisto por De Souza, 2002).

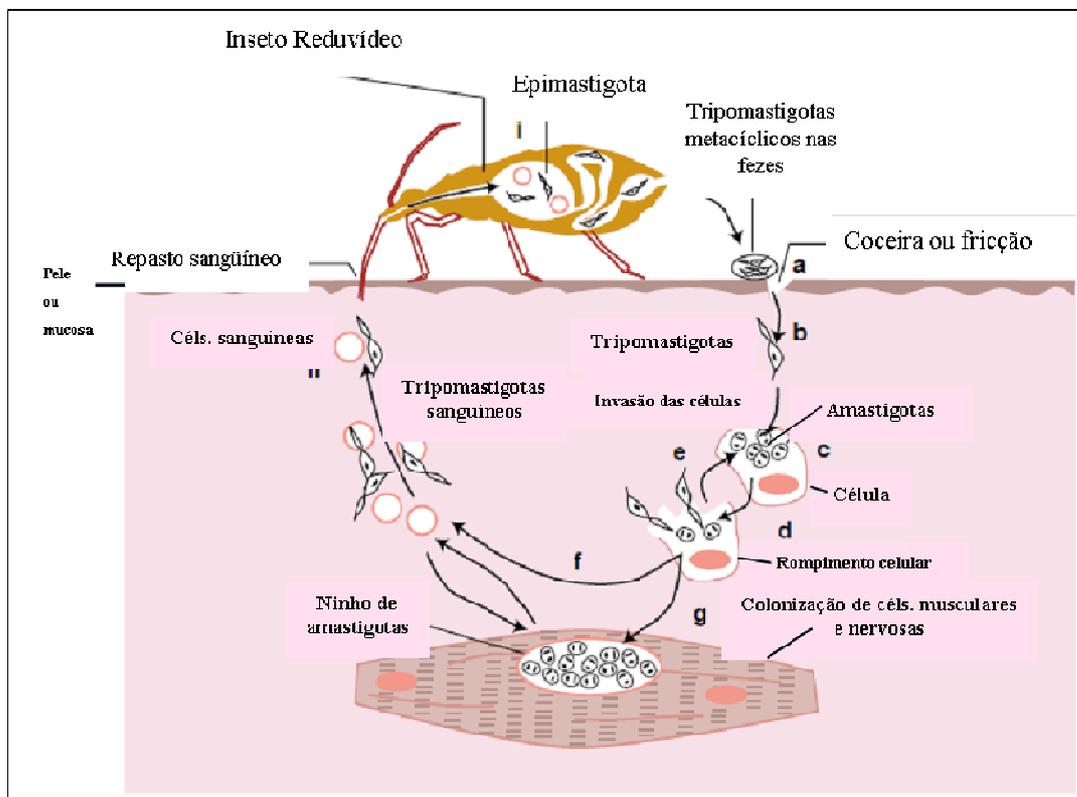


Figura 1: Desenho esquemático do ciclo biológico do *T. cruzi*. Adaptado de Macedo *et al*, 2002.

Pouco se sabe sobre o ciclo biológico dos tripanosomatídeos monoxênicos. O único ciclo completo descrito é o de *Blastocrithidia triatomae* em *Triatoma infestans*, que também é o inseto hospedeiro do *Trypanosoma cruzi* e do *Trypanosoma rangeli*, sendo ambos tripanosomatídeos

heteroxênicos. Entretanto, sabe-se que o trato digestivo dos hospedeiros invertebrados é o sítio preferencial para a colonização dos protozoários monoxênicos, que podem também serem encontrados em outros órgãos e tecidos, como os túbulos de Malpighi, assim como na hemolinfa do inseto (Wallace, 1966). Recentemente, o ciclo de *Blastocrithidia culicis* foi descrito em *Aedes aegypti*: este protozoário é capaz de colonizar o intestino médio do inseto e de chegar a hemocele para daí alcançar os ovários e a glândula salivar (Corrêa-da-Silva *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2010).

1.1.3 Endossimbiose em tripanosomatídeos

A bactéria simbiótica, presente no citoplasma de algumas espécies de tripanosomatídeos monoxênicos (Tabela 1), é normalmente observada próxima ao núcleo da célula hospedeira ou junto aos glicosomos, durante a sua divisão. Cada célula possui um único endossimbionte que se divide sincronicamente com o hospedeiro. Trabalhos recentes revalaram que o endossimbionte inicia sua replicação antes do corpo basal e o núcleo é a última organela a se dividir, antes da citocinese da célula hospedeira. Além disso, o endossimbionte sofre mudanças em sua forma durante esse processo de divisão (Motta *et al.*, 2010).

O endossimbionte é delimitado por duas unidades de membrana, uma mais externa e outra mais interna, sendo sua parede celular bastante reduzida. Esta bactéria simbiótica fecha ciclos metabólicos essenciais do hospedeiro, como aqueles relacionados com a produção de hemina, purina, aminoácidos e vitaminas (revisito por De Souza & Motta 1999).

A presença do endossimbionte está relacionada com alterações ultraestruturais no tripanosomatídeo hospedeiro. Deste modo, espécies que

abrigam a bactéria simbiótica apresentam estrutura paraflagelar bastante reduzida (Gadelha *et al.*, 2005), o DNA mitocondrial apresenta um arranjo mais largo e frouxo (Cavalcanti *et al.*, 2008) e os microtúbulos subpeliculares se encontram ausentes nas regiões onde os ramos mitocondriais tocam a membrana plasmática (Freymuller & Camargo, 1981). Além disso, a presença do endossimbionte altera a composição de carboidratos da membrana plasmática (Esteves *et al.*, 1982), como também a carga de superfície do protozoário hospedeiro (Oda *et al.*, 1984).

Tabela 1: Tripanosomatídeos que possuem bactéria simbiótica e seus respectivos hospedeiros (adaptado de De Souza & Motta, 1999).

Espécie	Hospedeiro	Referência
<i>Blastocrithidia culicis</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Novey <i>et al.</i> , 1907
<i>Crithidia deanei</i>	<i>Zelus leucogramus</i>	Mundim <i>et al.</i> , 1974
<i>Crithidia desouzai</i>	<i>Ornidia obesa</i>	Fiorini <i>et al.</i> , 1989
<i>Crithidia oncopelti</i>	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Newton & Horne, 1957
<i>Herpetomonas roitmani</i>	<i>Ornidia obesa</i>	Fiorini <i>et al.</i> , 1989; Faria e Silva <i>et al.</i> , 1991

1.1.4 Características morfológicas dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos, além de possuírem as estruturas eucarióticas típicas como o núcleo, o retículo endoplasmático, e o complexo de Golgi, possuem uma série de estruturas peculiares como a mitocôndria única e ramificada; o cinetoplasto, os reservossomos, os glicossomos, o flagelo com

sua estrutura paraflagelar e o citoesqueleto de microtúbulos subpeliculares, situado logo abaixo da membrana plasmática (Fig. 2) - (Revisto por De Souza, 2002, 2008).

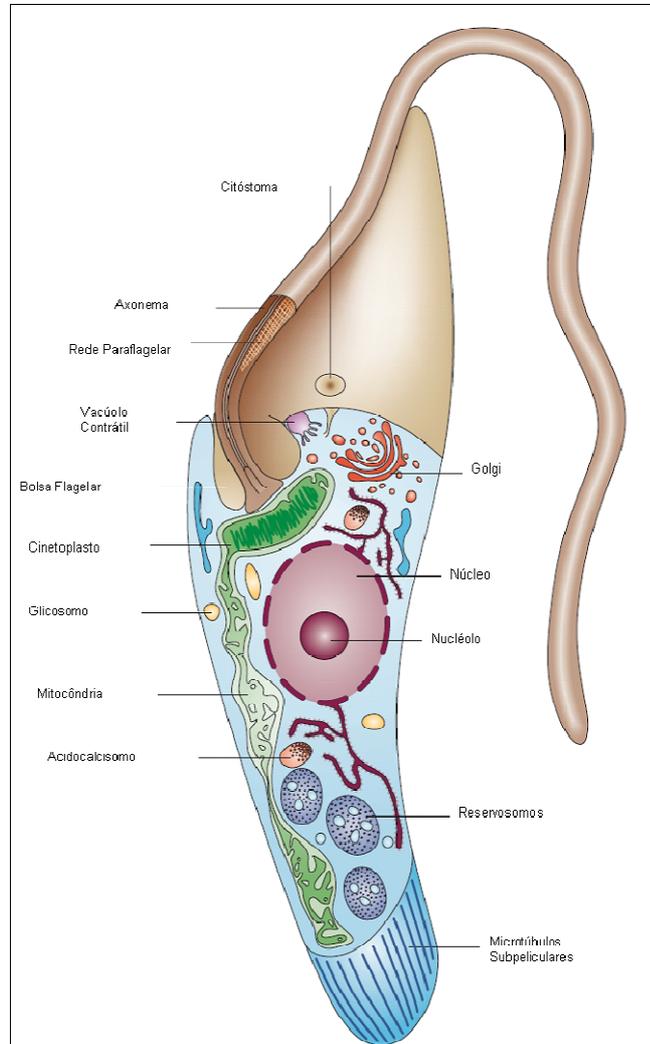


Figura 2: Representação esquemática da forma epimastigota do *T. cruzi*. Modificado a partir de um desenho de Flávia Moreira Leire, Universidade de Oxford (proposto por Docampo *et al.*, 2005).

A membrana plasmática é composta por lipídeos, carboidratos e proteínas. Na superfície celular, está presente o glicocálice formado por glicoproteínas, glicolipídeos e lipofosfoglicanos. No entanto, a maioria dos glicoconjugados se apresenta ancorada à membrana do protozoário via âncoras de glicosilfosfatidilinositol, moléculas que estão envolvidas em processos de interação com células hospedeiras. Técnicas de criofratura

permitiram a identificação de macro, micro e nanodomínios nas membranas celulares dos tripanosomatídeos. O citóstoma, por exemplo, pode ser observado na região anterior do protozoário, em um sítio pobre em partículas transmembrana e delimitado por fileiras de proteínas integrais (revisto por De Souza, 2007). Logo abaixo da membrana plasmática encontram-se os microtúbulos subpeliculares. Esses microtúbulos são resistentes a baixas temperaturas e à ação de drogas como a colchicina e o taxol. Além do mais, a estabilidade é garantida pela conexão protéica entre microtúbulos e entre estes e a membrana plasmática (revisto por De Souza, 2008).

Um corpo basal típico se encontra localizado na base do flagelo que emerge da bolsa flagelar destes protozoários. O flagelo possui um axonema formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. No entanto, em *T. cruzi*, junto ao axonema existe um arranjo complexo de filamentos protéicos conhecidos como estrutura paraflagelar (Farina *et al.*, 1986; Rocha *et al.*, 2010). Algumas funções essenciais são atribuídas a esta estrutura como a adesão a células e substratos, a motilidade e a citocinese (Portman & Gull, 2010).

Ainda na região anterior dos tripanosomatídeos, próximo à bolsa flagelar, é observada uma extensa rede composta por diversos túbulos conectados a um vacúolo central, referido como vacúolo contrátil. Recentemente, uma aquaporina, proteína envolvida no transporte de água foi identificada em epimastigotas de *T. cruzi* (Montalvetti *et al.*, 2004).

Em relação às organelas comuns aos eucariotos, sabemos que nos tripanosomatídeos o complexo de Golgi também é formado por cisternas paralelas e localiza-se entre o cinetoplasto e o núcleo, próximo à região da

bolsa flagelar. O retículo endoplasmático liso e o rugoso, assim como os lisossomos se apresentam como estruturas típicas de células eucariotas superiores. Já o núcleo, apresenta um envoltório típico com complexos do poro, sendo que nestes protozoários a membrana nuclear se mantém intacta durante o processo de divisão celular. O citoplasma dos tripanosomatídeos apresenta também os acidocalcissomos, estruturas vacuolares arredondadas com diâmetro bastante variável e com funções que incluem estoque de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e fosfatos; homeostase de pH e osmorregulação (Revisto por De Souza, 2008).

Nos tripanosomatídeos há dois tipos de organelas que participam do metabolismo energético: o glicosomo e a mitocôndria. O glicosomo é responsável pelo metabolismo glicolítico já que compartimentaliza as enzimas que participam da glicólise, otimizando assim a produção de ATP e justificando o nome da organela. Além disso, o glicosomo contém enzimas que participam de outros processos metabólicos essenciais como a β -oxidação de ácidos graxos, a via pentose-fosfato, a via de salvação de purinas e as vias de biossíntese de pirimidinas, de éter-lipídeos e de esqualenos (Opperdoes & Borst, 1977 e Michels *et al.*, 2006).

A mitocôndria nos tripanosomatídeos é a outra organela responsável pela obtenção de energia. Como uma mitocôndria típica, apresenta os complexos respiratórios e citocromos necessários para o funcionamento da cadeia respiratória, além de uma oxidase acessória à citocromo c oxidase, conhecida como oxidase alternativa, que não é sensível ao cianeto (Hill, 1976; Chaudhuri *et al.*, 2006). No entanto, há controvérsias sobre a existência do complexo I em tripanosomatídeos (Revisto por Opperdoes & Michels, 2008).

Cortes ultrafinos revelam aparentemente a mitocôndria como vesículas de forma elíptica (Fig. 3a). Entretanto, esta organela é unitária e ramifica-se ao longo do corpo celular, estando geralmente localizada logo abaixo dos microtúbulos subpeliculares, ou seja, próxima à membrana plasmática. Interessante destacar que *B. culicis*, uma espécie portadora de simbiote, não apresenta tais microtúbulos onde os ramos mitocondriais quase tocam à membrana plasmática do protozoário (Fig. 3b). A organização mitocondrial pode variar de acordo com a espécie: enquanto a forma epimastigota de *T. cruzi* possui um arranjo mais irregular da mitocôndria (Fig. 3c), em *B. culicis*, este arranjo é helicoidal e os ramos mitocondriais são mais numerosos (Fig. 3d) - (Paulin, 1975).

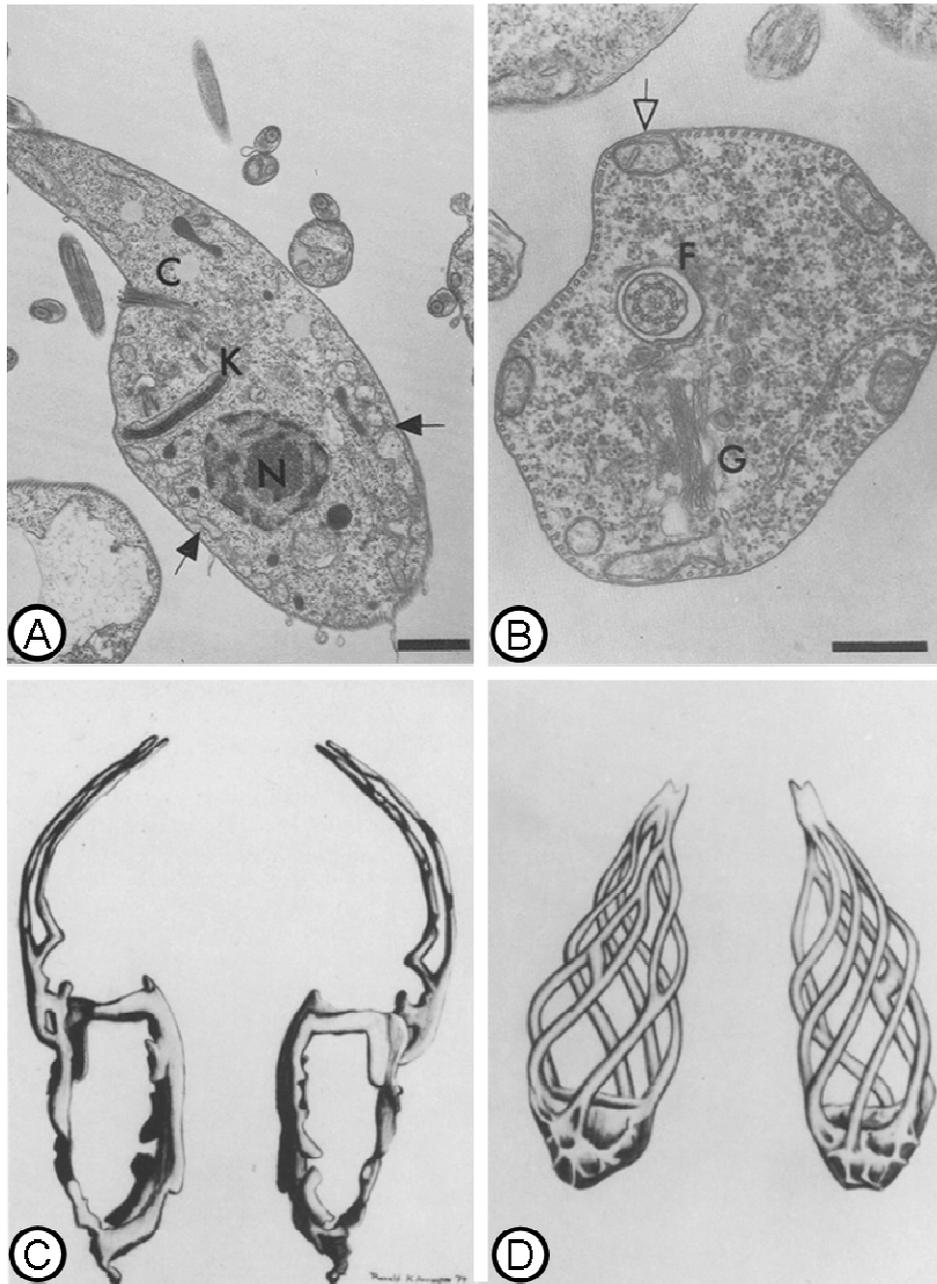


Figura 3: A mitocôndria de tripanosomatídeos (Retirado e adaptado de Paulin, 1975).

a – Micrografia de um epimastigota de *T. cruzi* mostrando perfis mitocondriais (setas) na periferia do corpo celular.

b – Micrografia de *B. culicis* onde podem ser observados seis perfis da mitocôndria. Notar a ausência dos microtúbulos subpeliculares onde os ramos mitocondriais quase tocam a membrana (seta).

c – Desenho esquemático da mitocôndria de epimastigotas de *T. cruzi*.

d - Desenho esquemático da mitocôndria de *B. culicis*.

1.2 O cinetoplasto: estrutura e mecanismo de divisão

O cinetoplasto é a estrutura que abriga o DNA mitocondrial de arranjo mais complexo da natureza, presente no interior da mitocôndria única e ramificada dos protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida. O DNA do cinetoplasto (kDNA) se encontra arranjado de modo a formar uma extensa rede (Fig. 4) e também tem como característica ser rico em sequências A-T (Guttman & Eisenman, 1965).

Essa rede é composta por moléculas circulares de DNA, chamadas de minicírculos e maxicírculos que se encontram catenados uns aos outros (Fig. 5). Dependendo da espécie, há algumas dezenas de maxicírculos de cerca de 20 a 40 kb e os minicírculos possuem alguns milhares de cópias com cerca de 0,5 a 10 kb (revisto por Lukes *et al.*, 2002). O DNA dos maxicírculos codifica RNAr e proteínas estruturais mitocondriais, enquanto o DNA dos minicírculos é responsável por codificar RNAs guias envolvidos no processo de edição dos transcritos de RNAm dos maxicírculos, tornando-os maduros para participar da síntese proteica mitocondrial (Revisto por Morris *et al.*, 2001). Codificar esses gRNAs é a única função descoberta até agora para os minicírculos (Revisto por Lukes *et al.*, 2002).

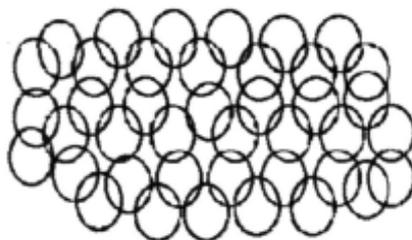


Figura 4: Desenho esquemático da organização da rede de k-DNA em tripanosomatídeos. Retirado de Shapiro & Englund, 1995.

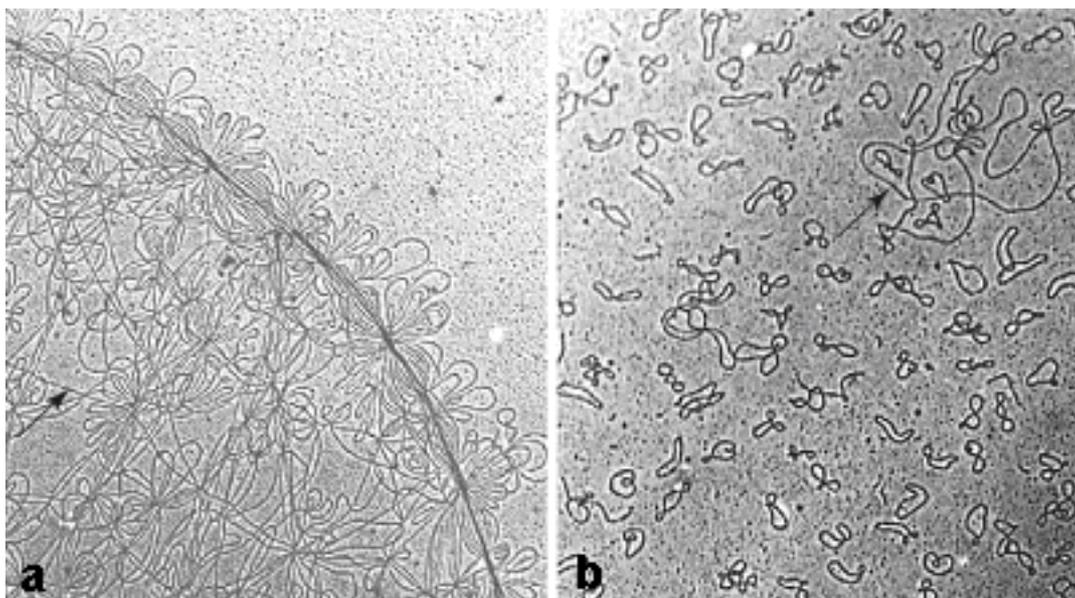


Figura 5: Rede de kDNA de *C. fasciculata* (adaptado de Liu *et al.*, 2005).
a – Rede intacta. Os *loops* menores representam os minicírculos e as fitas longas (seta) os maxicírculos.
b – Rede de kDNA decatenada por ação de uma topoisomerase do tipo II, mostrando minicírculos individuais e um maxicírculo (seta).

A estrutura do cinetoplasto, no entanto, apresenta diferenças no formato e no arranjo da rede de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento dos tripanosomatídeos. Em formas amastigota e epimastigota de *T. cruzi* e na maioria dos outros protozoários da família Trypanosomatidae, as fibrilas de kDNA se apresentam bastante compactadas e contidas em um cinetoplasto em forma de bastão (Fig. 6a). Em tripomastigotas de *T. cruzi*, a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão do cinetoplasto dá lugar a uma forma arredondada (Fig. 6b) (De Souza, 1984). Já os tripanosomatídeos que contêm endossimbionte possuem uma organização característica do cinetoplasto, apresentando fibrilas de DNA organizadas em um arranjo mais largo e frouxo, que preenche toda a matriz do cinetoplasto (Freymuller & Camargo, 1981; Cavalcanti *et al.*, 2008) – (Fig. 6c). Os vários graus de compactação do kDNA em tripanosomatídeos podem estar relacionados com a

ação de proteínas que condensam o DNA, como as KAPs (Kinetoplast Associated Proteins) ou as topoisomerases (Xu *et al.*, 1993, 1996).

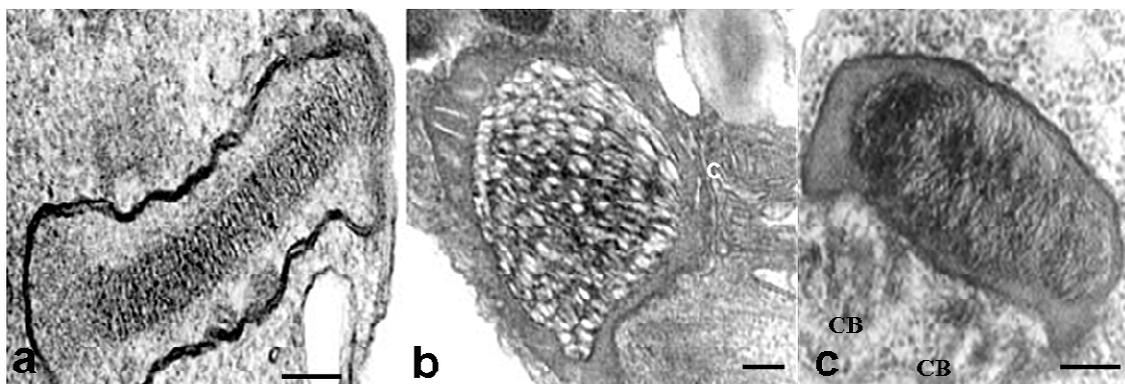


Figura 6: Diferentes formatos do cinetoplasto e variações nos arranjos da rede de kDNA nos tripanosomatídeos.

a – Epimastigotas de *T. cruzi*,

b – Tripomastigotas de *T. cruzi*,

c – *Blastocrithidia culicis*.

Fotos: a e c, Danielle Cavalcanti; b, Juliana Dutra.

Barras = 0,25 μ m.

O cinetoplasto encontra-se localizado próximo ao corpo basal, perpendicularmente ao eixo do flagelo, estando intimamente associado a este por filamentos que constituem o complexo de ligação tripartite (TAC) - (Fig. 7). Esse complexo é considerado o responsável pelo posicionamento espacial desta estrutura e pela segregação igualitária do kDNA entre as células-filhas (Ogbadoyi *et al.*, 2003). Entretanto, outros fatores estão relacionados à segregação do cinetoplasto como a síntese de esfingolipídeos (Fridberg *et al.*, 2008). O TAC é formado por três estruturas: os filamentos da zona de exclusão (z na Fig. 7), as membranas mitocondriais diferenciadas (em azul na Fig. 7) e os filamentos unilaterais (i, e na Fig. 7). Os filamentos da zona de exclusão ocupam a área entre o corpo basal e a membrana mitocondrial externa, sendo que sua presença exclui os ribossomos citoplasmáticos. Os filamentos

unilaterais ligam o kDNA à membrana mitocondrial interna e estão situados na zona cinetoflagelar (kfz na Fig. 7), definida como o espaço entre a rede e a membrana mitocondrial voltada para o corpo basal. Estes filamentos são divididos em filamentos unilaterais internos (i na Fig. 7) e externos (e na Fig. 7) - (Gluezn *et al.*, 2007). Entre os dois grupos de filamentos, existe uma região de membrana mitocondrial diferenciada, mais paralela que as outras áreas da membrana, sem cristas e resistente à extração por detergente (em azul na Fig. 7) - (Ogbadoyi *et al.*, 2003).

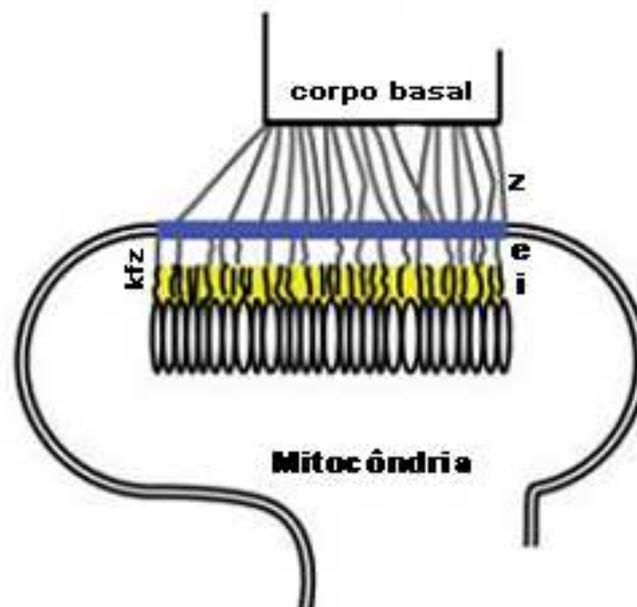


Figura 7: Diagrama esquemático do complexo de ligação tripartite (TAC). z corresponde aos filamentos da zona de exclusão; em azul, as membranas mitocondriais diferenciadas; e representam os filamentos unilaterais externos e i os internos que se encontram na zona cinetoflagelar (kfz). (Retirado e adaptado de Gluezn *et al.*, 2007).

Nos tripanosomatídeos a replicação do material genético mitocondrial coincide em parte com a fase S da replicação do material nuclear (Woodward & Gull, 1990; Elias *et al.*, 2007). A replicação do kDNA se inicia com a decatenação de cada minicírculo da rede por ação de uma topoisomerase do tipo II (Fig. 8, etapa 1). Os minicírculos são então liberados da rede em direção à zona KFZ. A replicação destes começa com a ligação das UMSBP (de Universal Minicircle Sequence Binding Protein) à sequência universal de minicírculos (UMS), que funciona como a origem de replicação. As primases sintetizam os primers necessários para o início da síntese de DNA. Os minicírculos são então replicados unidirecionalmente em estruturas- θ , formando fragmentos de Okasaki curtos (Fig. 8, etapas 2 e 3). Em seguida, os minicírculos já replicados migram para os pólos diametralmente opostos do cinetoplasto, lá ocorrem os seguintes eventos: remoção de primers por ação de uma endonuclease, preenchimento dos fragmentos de Okasaki por ação de uma Polimerase- β e união dos intervalos presentes nas fitas recém-sintetizadas por uma DNA ligase (Fig. 8, etapa 4). Os minicírculos que ainda apresentam intervalos em sua sequência são religados à periferia da rede próxima aos sítios antipodais por ação de uma topoisomerase do Tipo II (Fig. 9, etapa 5). Esse mecanismo garante que cada minicírculo seja replicado uma única vez. (revisado por Morris, 2001; Liu *et al.*, 2005). A segregação igualitária dos minicírculos é garantida pelo complexo de ligação tripartite (TAC), já que a distribuição da rede de kDNA entre as células-filhas ocorre de modo coordenado com a segregação dos corpos basais (Liu *et al.*, 2005). A Figura 9 apresenta, de uma maneira geral, o processo de replicação da rede de kDNA,

onde podemos observar a localização de cada enzima que participa deste processo, que estão listadas na Tabela 2.

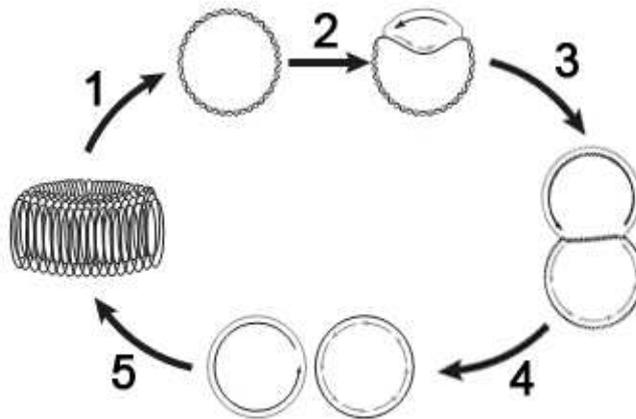


Figura 8: Desenho esquemático mostrando o processo replicativo dos minicírculos (Retirado e adaptado de Scocca & Shapiro, 2008).

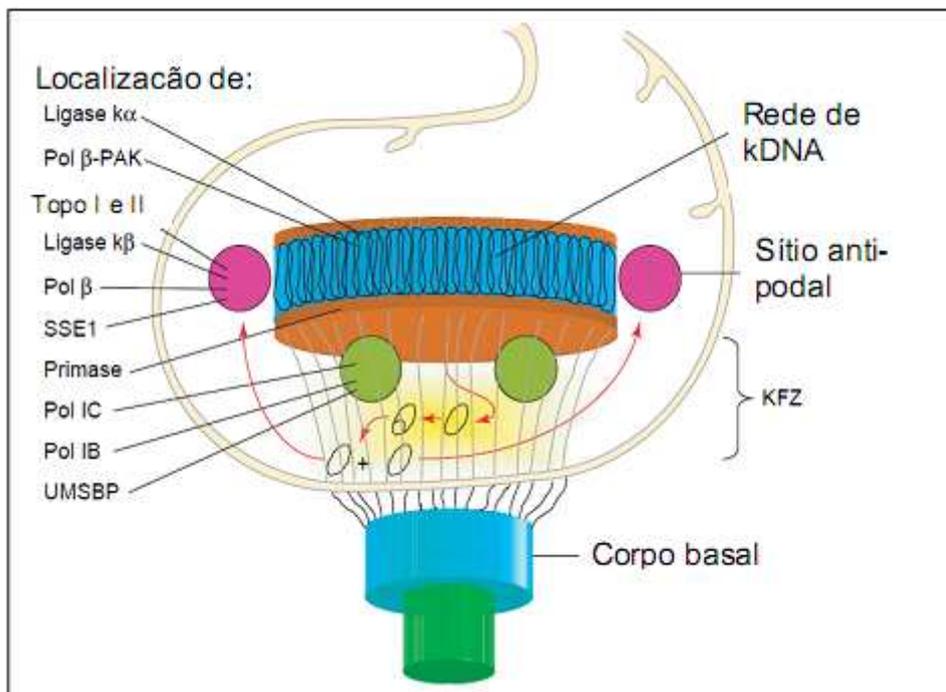


Figura 9: Desenho esquemático do processo de replicação da rede de kDNA em tripanosomatídeos. Retirado e adaptado de Liu *et al.*, 2005.

Tabela 2: Função das proteínas envolvidas no processo de replicação do kDNA.

Proteína/Enzima	Função
UMSBP	Ligar-se à origem de replicação para o início do processo
Primases	Síntese de primers para o início da replicação
Polimerase IB e IC	Replicação do DNA
Endonuclease-1	Remoção de primers
DNA Polimerase β	Preenchimento dos fragmentos de Okasaki
DNA Ligase $\kappa \beta$	Selar os <i>nicks</i> ainda presentes
Topoisomerase II	Destacar e ligar minicírculos à rede de kDNA

Pouco se sabe como ocorre a replicação dos maxicírculos se comparada a dos minicírculos. Este processo ocorre de modo unidirecional formando estruturas- θ (Figura 10), que não sofrem destacamento da rede de kDNA. (Carpenter & Englund, 1995; Liu *et al.*, 2005). A replicação dos maxicírculos é controlada por uma protease (HsIVU), que degrada reguladores, envolvidos na replicação de mini e maxicírculos. Deste modo, este processo pode ser interrompido no tempo correto do ciclo celular, garantindo o tamanho apropriado da rede de kDNA (Li *et al.*, 2008).

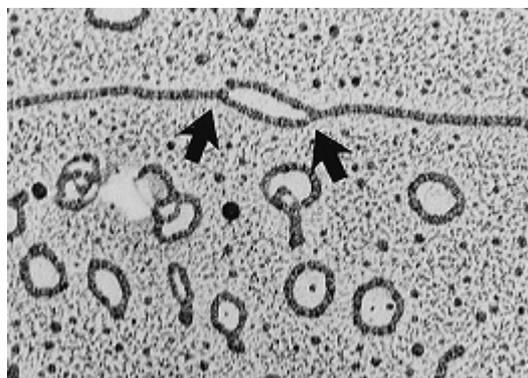


Figura 10: Micrografia eletrônica mostrando um maxicírculo de *T. brucei*. Setas indicam estruturas- θ em estágio inicial de replicação (Carpenter & Englund, 1995).

1.3 Quimioterapia na doença de Chagas

Desde a descoberta da Doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), diversas estratégias vem sendo desenvolvidas para o controle desta enfermidade. Programas de controle de transmissão pelos insetos vetores ou por transfusão sanguínea foram implementados nos últimos anos. Além disso, diversos aspectos da biologia celular do parasita são estudados com a finalidade de desenvolver novas estratégias e compostos quimioterápicos para um melhor tratamento da doença.

A inibição de proteases, como a cruzipaina pode dificultar a invasão do parasita (Meirelles *et al.*, 1992). Como o processo de adesão dispara mecanismos de fosforilação e defosforilação, a utilização de inibidores de proteínas quinases inibe significativamente a infecção (Vieira *et al.*, 1994). O bloqueio da glicosilação também pode ser um alvo interessante, pois resíduos de carboidratos se encontram envolvidos nos passos iniciais da interação parasita/célula hospedeira (Previato *et al.*, 1998). Além disso, como as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) associam um grande número de proteínas à membrana plasmática, drogas que inibem enzimas-chave da biossíntese dessas âncoras são de grande interesse quimioterápico (Docampo & Moreno, 2001).

A respeito da divisão celular, a inibição de diferentes pontos do ciclo celular e o uso de drogas que afetam a estabilidade dos microtúbulos podem reduzir a proliferação do protozoário (Gull, 2002; Croft & Yardley, 2002). Além disso, estudos que utilizam inibidores de cruzipaina revelaram que ocorre acúmulo desta enzima, inibindo a proliferação de epimastigotas e amastigotas

de *T. cruzi* e interrompendo o processo de transformação de formas não infectivas em formas infectivas (Meirelles *et al.*, 1992).

Entre as organelas alvo, estão os acidocalcissomos. Drogas utilizadas no tratamento de reabsorção óssea em humanos, como o pamidronato e alendronato também vêm sendo usados para bloquear seletivamente a proliferação de *T. cruzi*. Isto porque, tais compostos inibem a bomba de prótons dependente de pirofosfato cujo funcionamento é essencial para o funcionamento dos acidocalcissomos (Urbina *et al.*, 1999). O cinetoplasto também tem sido tratado como um potencial alvo para o desenvolvimento de quimioterápicos e neste trabalho será tratado como o principal modelo de estudo.

1.3.1 O Cinetoplasto como alvo quimioterápico

Considerando a origem simbiótica da mitocôndria, o DNA do cinetoplasto apresenta características tipicamente procariotas, como as enzimas envolvidas no processo de replicação do kDNA. Entre estas, as topoisomerases constituem alvos quimioterápicos importantes, tanto em células tumorais, como nos tripanosomatídeos patogênicos. Isto porque, estas enzimas desempenham papéis essenciais em diversos processos celulares, tais como replicação, transcrição, reparo e recombinação, deste modo participando diretamente na topologia e organização do DNA (Champoux, 2001). Importante mencionar, que as topoisomerases de tripanosomatídeos se distinguem das topoisomerases de seu hospedeiro humano, reforçando a ideia de que estas enzimas constituem um potencial alvo para a quimioterapia contra estes parasitos (Balaña-Fouce *et al.*, 2006).

As DNA topoisomerasas são divididas em dois grupos, de acordo com seu mecanismo de ação. As enzimas do tipo I (topo I) agem introduzindo uma quebra transitória em uma das fitas de DNA, enquanto as do tipo II (topo II) clivam as duas fitas. Em procariotos as topoisomerasas do tipo II são conhecidas como girases. Nos tripanosomatídeos, as DNA topoisomerasas do tipo II além de atuarem na topologia do DNA nuclear, participam ativamente do processo de replicação do kDNA, decatenando minicírculos da rede no início da replicação e os religando à rede no término da replicação. Além disso, atuam na separação dos círculos recém sintetizados para que estes sejam posteriormente segregados (revisto por Liu *et al.*, 2005).

Os inibidores de topoisomerasas pertencem a diversas classes de compostos e podem atuar de maneira direta ou indireta no momento da replicação dos minicírculos (Fig. 11). Inibidores dessas enzimas foram primeiramente testados em terapias antitumorais (Broxterman *et al.*, 2001; Nitiss *et al.*, 2002; Denny *et al.*, 2003) e também em infecções microbianas (Shapiro *et al.*, 1993; Bodley *et al.*, 1995a; Bearden *et al.*, 2001). Quando usados contra parasitas da família Trypanosomatidae, os inibidores de DNA topoisomerasas foram considerados drogas em potencial, pois são menos citotóxicas para as células eucariotas do organismo hospedeiro (Das *et al.*, 2004; Deterding *et al.*, 2005).

Os inibidores de DNA topoisomerasas podem ser classificados em drogas de classe I ou "topoisomerase poisons", que atuam estabilizando o complexo covalente enzima-DNA e promovendo a quebra da dupla fita de DNA ou drogas de classe II ou "topoisomerase inhibitors", que atuam interferindo nas funções catalíticas das DNA topoisomerasas, competindo com a ligação ao

ATP, mas sem estabilizar o complexo DNA-enzima (revisto por Das *et al.*, 2004; Motta, 2008). Há um outro tipo de classificação de inibidores de topoisomerasas que leva em conta somente o tipo de enzima alvo e assim são denominados como inibidores de topoisomerasas do tipo I ou inibidores de topoisomerasas do tipo II. Existem ainda os inibidores duplos, que agem sobre ambos os tipos de enzima. A tabela 3 mostra um resumo de diversas classes de drogas inibidoras de DNA topoisomerasas e seus respectivos alvos de ação.

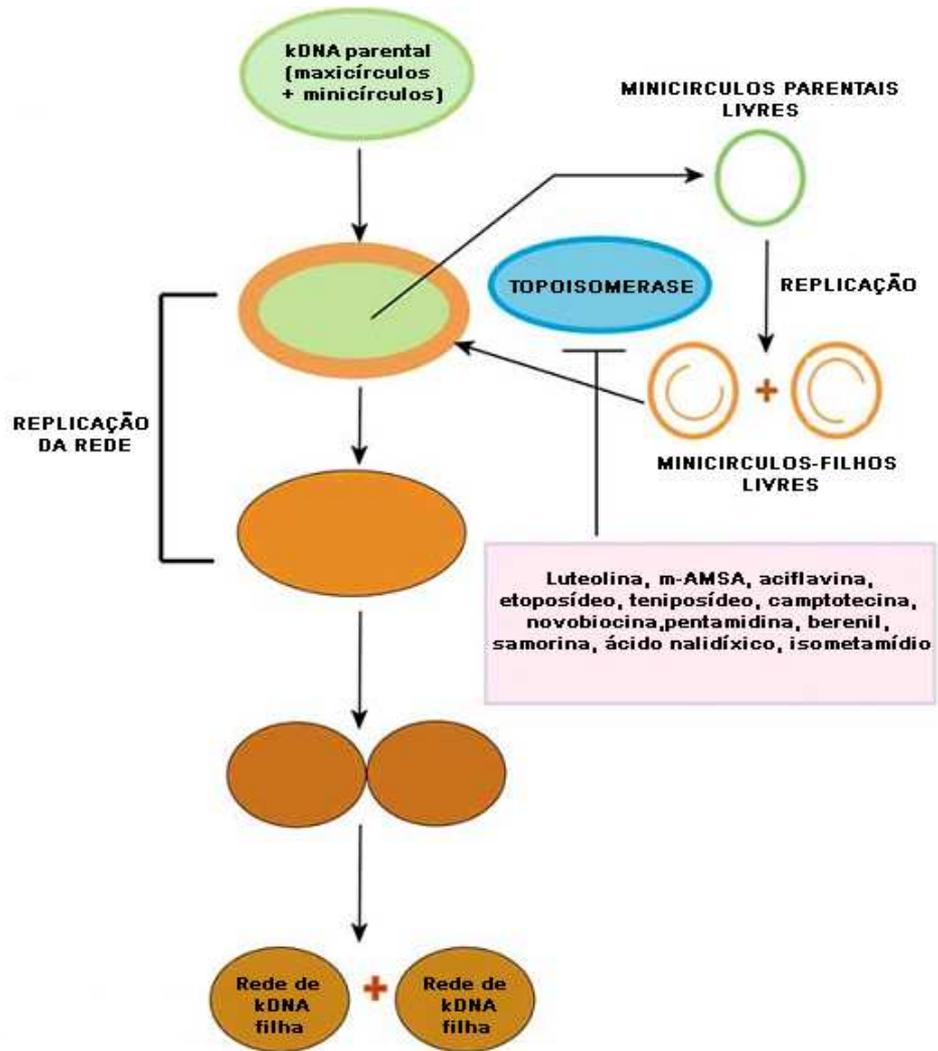


Figura 11: Representação esquemática do processo de replicação da rede de kDNA e onde atuam os diversos compostos conhecidos como inibidores de topoisomerases, citados no quadro rosa. Minicirculos verdes equivalem aos minicirculos parentais e os minicirculos laranjas correspondem aos minicirculos pós-replicados. Retirado e adaptado de Sen & Majumder, 2008.

Tabela 3: Classificação dos inibidores de DNA topoisomerases e seus respectivos alvos (Retirado e adaptado de Das *et al.*, 2004)

Classe de drogas	Inibidores de topoisomerases	Tipos de topoisomerases
<i>Quinolonas</i>	Ácido nalidíxico, ácido oxonílico	Girase, Topo II tripanosomatídeos
<i>Fluoroquinolonas</i>	Ácido piromídico, norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, enoxacina	Girase/Topo II
<i>Indoloquinolonas</i>		Topo I, Topo II
<i>Coumarinas</i>	Novobiocina, coumermicina, clorobiona	Girase, Topo II
<i>Antraciclinas</i>	Adriamicina, doxorubicina, daunorubicina	Girase e Topo II
<i>Podofilotoxinas</i>	Teniposídeo, etoposídeo, etofos, NK611	Topo II
<i>Alcalóides</i>	Camptotecina, topotecan, CPT-II, nitidina	Topo I
<i>MGDBs</i>	Distamicina, Hoescht 33342, berenil, netropsina	Topo I
<i>Acridinas</i>	m-AMSA, 9-anilino-acridinas	Topo II
<i>Elipticinas</i>	2-methyl, 9-hydroxy-elipticinium, pazeliptina, anatoxina, dateliptium	Topo II
<i>Antibióticos</i>	Saintopina, topostina, stretonigrina	Topo I, Topo II
<i>Benzofenazina</i>	NC-190	Topo II
<i>Flavonóides</i>	Genisteína, woodfructicosina	Topo I, Topo II
<i>Flavonóides</i>	Luteolina, quercetina	Topo I, Topo II
<i>Terpenóides</i>	Terpenticina, cleroxidina	Topo I, Topo II
<i>Triterpenóides</i>	Ácido betulínico, ácido dihidrobetulínico	<i>Leishmania</i> topo I, topo II
<i>Dioxopiperazina</i>	Sobuzoxana, razoxana, ICRF-154, ICRF-193	Topo II
<i>Indolocarbazol</i>	ED-110, KT-6528	Topo I
<i>Macaluvaminas</i>	Derivados de macaluvamina	Topo II
<i>Antimoniais</i>	Estibogluconato de sódio, estibamina uréica	<i>Leishmania</i> topo I
<i>Bis-naftoquinonas</i>	Diospirina	<i>Leishmania</i> topo I
<i>Liganolides</i>	(-)-Arctigenina, (-)-traquelogenina	Topo II

1.4 Drogas ligantes do DNA

Compostos que se ligam ao DNA são extremamente úteis para identificar e visualizar esta molécula, tanto *in vitro*, como no interior das células. Além disso, nos últimos anos estes compostos têm se mostrado promissores para terapias anti-tumorais, despertando assim um grande interesse médico. Tais compostos podem ser considerados agentes intercalantes, quando se ligam entre as bases da molécula de DNA ou drogas que se ligam à cavidade menor do DNA (Fig. 12). No entanto, compostos da família das antraciclinas podem apresentar ambos os estados, como exemplificado na figura 13 que mostra a ligação da daunomicina ao DNA (Mukherjee *et al.*, 2008).

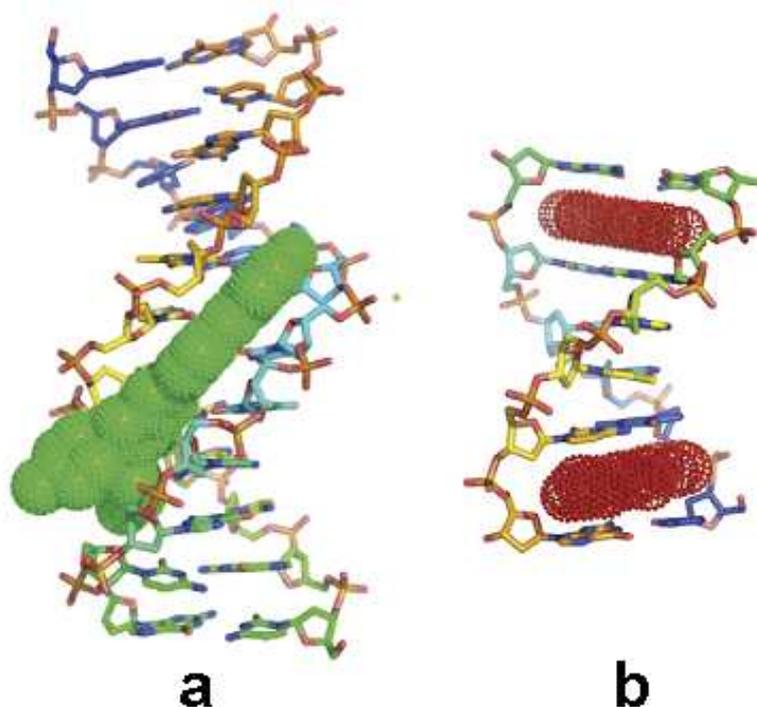


Figura 12: Exemplo de compostos ligantes ao DNA.
a – o composto Hoescht33258 (em verde) está ligado ao sulco menor da molécula de DNA.
b – a elipticina (em vermelho) está ligada entre os pares de bases da molécula de DNA, o que caracteriza um agente intercalante.
(adaptado de Palchaudhuri & Hergenrother, 2007).

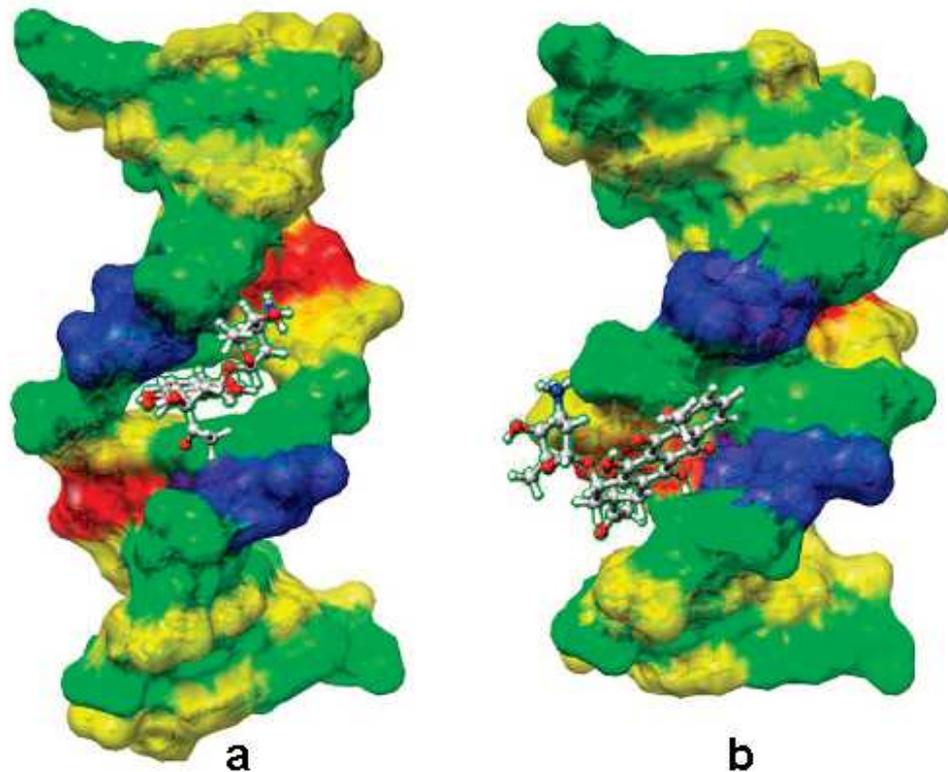


Figura 13: Daunomicina. Este composto pode ligar-se à molécula de DNA de duas diferentes maneiras:

a – em estado intercalante

b – em estado ligado ao sulco menor da molécula de DNA

(retirado de Mukherjee *et al.*, 2008)

1.4.1 Drogas que se ligam à cavidade menor do DNA

Os compostos que se ligam ao DNA não induzem grandes mudanças conformacionais nesta molécula e atuam de forma similar a uma ligação chave-fechadura (Jonathan, 1997). Tais compostos já tiveram seus efeitos descritos em tripanosomatídeos, como o berenil (Fig. 14) - (Peregrine & Mamman, 1993; Egbe-Nwiyi *et al.*, 2003, 2005; Witola *et al.*, 2005). Este composto se liga ao kDNA, não de modo intercalante, mas através de ligações específicas com a região do sulco menor, principalmente nos sítios ricos em bases A-T (Brack *et al.*, 1972; Peregrine & Mamman, 1993). Em 1990, Shapiro & Englund

mostraram que o berenil inibe a atividade da topoisomerase II mitocondrial de tripanosomatídeos. Acredita-se que a ligação do berenil ao DNA, impede a formação do complexo DNA-topoisomerase, o que poderia explicar a redução da atividade desta enzima (Portugal, 1994).

Um outro bom exemplo de composto ligante é a distamicina. Esta droga é classificada como uma diamidina aromática e já foi testada com sucesso em células infectadas com vírus oncogênicos, neste caso inibindo a transcriptase reversa viral, e também contra infecções provocadas por *Pneumocystis carinii* em pacientes com AIDS (De Clerq & Dann, 1980; Tidwell *et al.*, 1990; Stockert *et al.*, 1997). Em tripanosomatídeos, a distamicina não altera a ultraestrutura de epimastigotas de *T. cruzi*, no entanto, inibe a proliferação celular em concentrações altas (100µM) (Zuma, 2010). Outros compostos também pertencentes à classe de diamidinas aromáticas tiveram efeito tripanomicida em *T. cruzi*. Além de causarem morte celular nas três formas evolutivas deste tripanosomatídeo, promoveram também efeitos ultraestruturais na mitocôndria, no cinetoplasto, no complexo de Golgi e nos microtúbulos subpeliculares (Batista *et al.*, 2010).

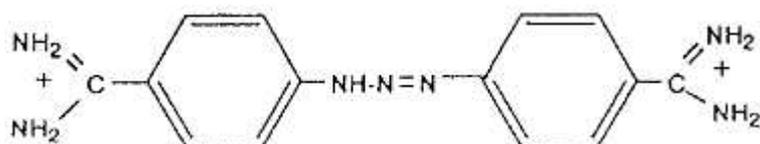


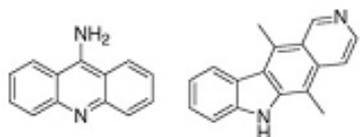
Figura 14: Fórmula química do berenil. (González *et al.*, 1999).

1.4.2 Agentes intercalantes

Lerman, em 1961, foi o primeiro a utilizar o termo “intercalante” ao se referir a interação de um composto com uma molécula de DNA. A ação do agente intercalante foi definida como a inserção de uma estrutura planar entre pares de base do DNA, resultando em diminuição da torção e do alongamento do DNA. Os intercalantes podem ser classificados em típicos, quando possuem dois ou três anéis fusionados ou intercalantes atípicos, quando não possuem os anéis fusionados (Fig. 15) - (revisto por Palchaudhuri & Hergenrother, 2007).

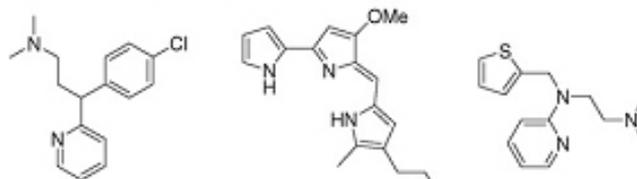
Os intercalantes de DNA têm sido usados como antitumorais, antineoplásticos e agentes antibióticos contra bactérias e fungos. No entanto, nem todos os intercalantes possuem efeito genotóxico, caracterizado pela capacidade de alterar o material genético (Mukherjee *et al.*, 2008). Intercalantes promoveram efeitos variados em diferentes modelos biológicos. Em *E. coli*, o tratamento com acriflavina promoveu o aparecimento de estruturas lamelares na membrana plasmática e de áreas onde as proteínas integrais estavam ausentes (Nakamura *et al.*, 1982). Em leveduras, a acriflavina promoveu queda do número de fungos e da viabilidade celular, além de redução da atividade da cadeia respiratória. Dados obtidos por microscopia de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram necrose e apoptose das leveduras tratadas com acriflavina (Keyhani *et al.*, 2009).

Intercalantes típicos



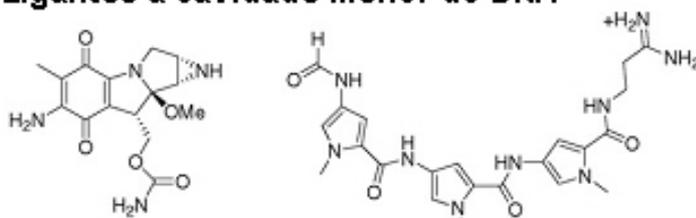
9-Aminoacridina Elipticina

Intercalantes atípicos



Clorfeniramina Prodigiosina Methapyriline

Ligantes à cavidade menor do DNA



Mitomicina

Distamicina

Figura 15: Exemplos de compostos intercalantes típicos e atípicos e compostos que se ligam à cavidade menor da molécula de DNA. (Retirado e adaptado de Palchaudhuri & Hergenrother, 2007).

1.4.3 Acriflavina

A acriflavina é classificada como uma aminoacridina, um derivado da família das acridinas, sendo formada por uma mistura de dois compostos: o cloreto de 3,6-diamino-10-metilacridínio e a 3,6-acridinodiamina (Fig. 16) - (www.sigmaaldrich.com).

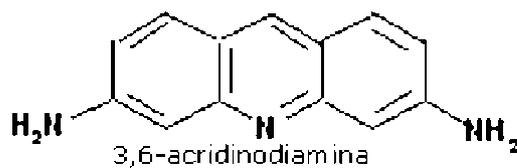
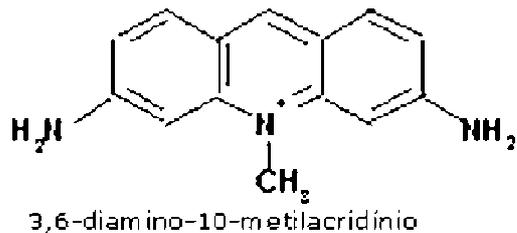


Figura 16: Compostos formadores da acriflavina e suas respectivas fórmulas estruturais (www.sigmaaldrich.com).

Os relatos sobre esta droga são muito antigos e remetem ao início do século XX, quando foi sintetizada por Paul Erlich, em 1912. Anos depois, a acriflavina seria usada na Primeira Guerra Mundial em pacientes portadores da Doença do Sono (Encyclopædia Britannica, 2010).

A acriflavina é um intercalante típico e apresenta afinidade por DNA rico em sequências A-T (Tubbs *et al.*, 1964). Os efeitos citotóxicos ou mesmo genotóxicos para esta droga ainda são controversos. O uso da acriflavina é de certa forma, restrito, sendo mais comumente utilizado como antisséptico urogenital de animais como ovinos, caprinos, eqüinos, cães e gatos (Fig. 17). A acriflavina também pode ser encontrada disponível no mercado para a desinfecção de aquários e para o tratamento de micoses e infecções bacterianas em peixes (Fig. 18).



Figura 17: Acriflavina em pó vendida pela Drag Pharma (Chile). Possui uso recomendado para desinfecção de feridas e da mucosa urogenital de animais. <http://www.dragpharma.cl/veterinaria/fichas.php.index.htm>



Figura 18: Acriflavina vendida pela empresa Kordon (Estados Unidos). O uso é recomendado para desinfecção de ovos de peixes de aquário, tratamento de feridas e infecções externas provenientes de protozoários. <http://www.novalek.com/kordon/Acriflavine/index.htm>

A partir da década de 1960, alguns trabalhos descreveram diversos efeitos da acriflavina em diferentes espécies de tripanosomatídeos, sob o ponto de vista ultraestrutural, bioquímico e molecular. Em 1964, Trager & Rudzinska definiram o termo discinetoplastia como alterações na rede de kDNA, sendo que a estrutura do cinetoplasto permanece presente. Este fenômeno se mostrou frequente em protozoários que foram tratados com drogas ligantes do DNA. A discinetoplastia, no entanto, também pode ocorrer de forma natural (Tabela 4).

Tabela 4: Discinetoplastia em tipanosomatídeos mencionada por ordem cronológica da descrição (Retirado e adaptado de Schnauffer *et al.*, 2002).

Espécie	Condição	Referência
<i>T. evansi</i>	Natural	Hoare & Bennet, 1937
<i>T. equiperdum</i>	Natural	Tobie, 1951
<i>C. fasciculata</i>	Acriflavina	Hill & Anderson, 1969
<i>T. brucei</i>	Acriflavina	Stuart, 1971
<i>T. equiperdum</i>	Natural	Hajduk, 1976
<i>T. equiperdum</i>	Natural	Hajduk & Cosgrove, 1979
<i>T. equiperdum</i>	Berenil	Riou & Benard, 1980
<i>T. equiperdum</i>	Br. Et., acriflavina	Riou <i>et al.</i> , 1980
<i>T. brucei</i>	Acriflavina	Stuart & Gelvin, 1980
<i>T. equinum</i>	Natural	Cuthbertson, 1981
<i>T. evansi</i>	Cultura axênica	Zweygarth <i>et al.</i> , 1990
<i>T. brucei</i>	Br. Et., acriflavina, verapamil	Agbe & Yielding, 1993
<i>T. evansi</i>	Para-rosanilina	Silva-Tahat <i>et al.</i> , 1995
<i>T. evansi</i>	Natural	Ventura <i>et al.</i> , 2000
<i>T. brucei</i>	RNAi de Topo II	Wang & Englund, 2001
<i>C. fasciculata</i>	Br. Et.	Biscardi <i>et al.</i> , 2001

Br. Et = Brometo de etídeo

Além da discinetoplastia, outros efeitos causados pela acriflavina, foram descritos em tripanosomatídeos, tais como: a inibição da replicação do kDNA em *C. luciliae* (Steinert & VanAssel, 1967); alterações ultraestruturais na rede de k-DNA em *C. fasciculata* (Anderson & Hill, 1969), *T. brucei* (Stuart, 1971), *T. equiperdum* (Hajduk, 1979); inibição da proliferação celular em *C. fasciculata* e *T. equiperdum* (Hajduk, 1979); inibição da síntese de DNA em *L. tarentolae* (Simpson, 1968); redução do consumo de O₂ em *C. fasciculata* (Bacchi & Hill, 1972); perda de sequências de k-DNA em *T. brucei* (Riou *et al.*, 1980); linearização de minicírculos em *T. equiperdum* (Shapiro *et al.*, 1989) entre diversos outros relatos.

No presente trabalho, verificamos o efeito da acriflavina na proliferação, ultraestrutura e consumo de O₂ na forma epimastigotas de *T. cruzi* e em *B. culicis*. Utilizamos estas duas espécies por apresentarem arranjo de kDNA distinto, assim constituindo modelos biológicos ideais para o estudo da topologia, da replicação e da segregação do kDNA.

2 Racional

O cinetoplasto dos tripanosomatídeos apresenta características únicas quanto à sua composição e estrutura, já que o DNA mitocondrial nele contido está organizado em uma extensa rede de círculos catenados. Há relatos na literatura mostrando que a acriflavina promove intensas alterações no DNA e na funcionalidade mitocondrial de tripanosomatídeos. O cinetoplasto vem sendo apontado como o principal alvo deste composto, que se liga seletivamente à sequências A-T ricas presentes no kDNA. Deste modo, a acriflavina constitui uma excelente ferramenta nos estudos sobre o modelos de replicação e de segregação da rede de kDNA.

A acriflavina não é empregada para fins quimioterápicos em pacientes acometidos pelas doenças causadas por tripanosomatídeos patogênicos. Entretanto, o seu uso neste trabalho também apresenta grande importância comparativa com as drogas ligantes de DNA. Tais compostos são intensamente utilizados nos tratamentos contra células cancerígenas e mais recentemente como agente tripanomicida.

Os efeitos da acriflavina quanto à proliferação, ultraestrutura e consumo de oxigênio nunca foram testados nas formas epimastigota de *T. cruzi* e de *B. culicis*, protozoários que apresentam diferenças quanto ao arranjo da rede de kDNA. Neste trabalho realizamos pela primeira vez a fina descrição dos efeitos ultraestruturais da acriflavina no arranjo do kDNA. Além disso, utilizamos técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas para a melhor compreensão dos mecanismos de segregação desta rede, bem como para esclarecer a sua composição. Realizamos também experimentos que avaliam os efeitos da acriflavina no consumo de oxigênio para deste modo relacionarmos possíveis

efeitos ultraestruturais à funcionalidade da mitocôndria, principal organela do metabolismo energético nestes protozoários.

3 Objetivos

**“Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há
esperança para ela.”**

Albert Einstein

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos da acriflavina em tripanosomatídeos que apresentam diferentes arranjos da rede de kDNA quanto à proliferação celular, ultraestrutura e consumo de O₂.

3.2 Objetivos específicos:

- Analisar o efeito da acriflavina na proliferação de *B. culicis* e da forma epimastigota de *T. cruzi* por contagem em curvas de proliferação celular.
- Verificar os efeitos da acriflavina na ultraestrutura dos protozoários tratados com a droga, por microscopia eletrônica de transmissão de rotina e por técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas.
- Avaliar o efeito da acriflavina na indução de discinetoplastia nos tripanosomatídeos tratados com este intercalante por técnicas de microscopia óptica e eletrônica.
- Estudar o efeito da acriflavina no consumo de oxigênio de tripanosomatídeos por respirometria.

4 Material e métodos

“Bem feito é melhor do que bem explicado.”

Benjamin Franklin

4.1 Cultivo celular:

B. culicis foi cultivada em meio Warren (Warren, 1960), suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 28° C por 24 horas. Após o crescimento os protozoários foram mantidos na geladeira a 4°C, até o novo repique. Já os epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) foram cultivados em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) (Camargo, 1964), com 10% de soro fetal bovino e mantido em estufa a 28° C.

4.2 Curvas de crescimento: ação da acriflavina na proliferação celular:

As curvas de proliferação celular foram feitas usando um inóculo inicial de 1×10^6 células.mL⁻¹ de protozoários em fase exponencial. A acriflavina, previamente diluída em água deionizada, foi adicionada ao cultivo celular em fase exponencial de crescimento, ou seja, após 24 horas, no caso de epimastigotas de *T. cruzi* ou 12 horas no caso de *B. culicis*. Em seguida, foram retiradas alíquotas das culturas a cada 12 horas ou a cada 24 horas, considerando o tempo de geração de cada espécie e foi feita a fixação destas células com formalina (formaldeído 4,4% diluído em PBS) para a contagem por microscopia óptica em câmaras de Neubauer. Foram usadas as seguintes concentrações de acriflavina: 1, 5, 10, 25 e 50µg.mL⁻¹, considerando relatos prévios na literatura (Bacchi & Hill, 1972; Riou *et al.*, 1980). Para curvas de crescimento de *B. culicis* o tempo total de tratamento foi de 96 horas e para curvas de *T. cruzi*, de 120 horas.

4.3 Longo cultivo em presença de acriflavina:

Com o objetivo de verificar se as células seriam capazes de resistir a um longo período de tratamento com acriflavina, epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivados a 28°C em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino em um volume final de 50ml. A acriflavina foi adicionada após 24 horas de cultivo, em uma concentração final de 5µg.ml⁻¹. Depois disso, a cada 72 horas uma alíquota desta cultura foi retirada para quantificação de células discinetoplásticas por microscopia óptica, outra parte para processamento por microscopia eletrônica de transmissão e outra parte para avaliação da viabilidade celular para observação dos efeitos da acriflavina por até 8 dias (192 h) . Juntamente com a retirada das alíquotas, foi acrescido meio de cultura e soro fetal bovino fresco na mesma proporção citada acima, sendo que a acriflavina foi mantida na mesma concentração.

Tabela 5: Resumo cronológico do experimento de longo cultivo em presença de acriflavina.

Tempo 0	Inóculo
24 horas	Adição da droga
48 horas	1° ponto / Repique
120 horas	2° ponto / Repique
192 horas	3° ponto / Repique

4.4 Avaliação da viabilidade celular

Com a finalidade de observar a viabilidade dos protozoários tratados com a acriflavina, utilizamos uma solução de azul de tripan a 0,1%. As alíquotas retiradas das culturas nos mesmos três pontos do experimento de longo cultivo e inoculadas com a solução de azul de tripan por cinco minutos. Após este intervalo, uma lâmina é montada para a visualização de células viáveis e inviáveis por microscopia óptica de campo claro.

4.5 Quantificação de células discinetoplásticas utilizando o método do Panótico Rápido:

O Panótico Rápido (Laborclin) é um método utilizado em hematologia e baseia-se no princípio de coloração estabelecido por Romanowsky, que permite a visualização de compartimentos contendo DNA. Os reagentes utilizados são os seguintes: Panótico rápido n^o1 (triarilmetano 0,1%); Panótico rápido n^o2 (xantenos 0,1%) e panótico rápido 3 (tia zinas 0,1%).

Para o uso desta técnica, uma alíquota das células é retirada e lavada duas vezes em solução salina tamponada (PBS), fixada em formalina (Formaldeído 4,0% em PBS) por 30 minutos e espalhada sobre uma lâmina. A secagem é feita à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas são submergidas nos 3 reagentes na ordem enumerada, 5 segundos cada etapa. As lâminas são então, lavadas com água destilada e em seguida secas na posição vertical, à temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas já estão prontas para serem visualizadas em microscópio óptico de campo claro. Esta coloração permite a visualização do cinetoplasto e do núcleo dos tripanossomatídeos.

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão:

4.6.1 Preparação de rotina:

As células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por no mínimo 1 hora. Em seguida, foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio (OsO_4), 1% ferrocianeto de potássio ($\text{K}_1\text{Fe}(\text{Cn})_6$) 0,8% e cloreto de cálcio 5mM diluídos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, por 1h, a temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 2x 100%) – 10 minutos em cada etapa. Em seguida, o material foi infiltrado por aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente, em resina Polybed diluída em igual proporção em acetona 100%.

Posteriormente, o material foi infiltrado em resina Polybed pura por 5h, e após este tempo incluído na mesma resina e polimerizado a 60°C por 48h. Os cortes ultrafinos obtidos foram contrastados em solução de acetato de uranila aquosa 5% por 45 min e citrato de chumbo por 5 minutos. As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico Zeiss 900 ou Jeol 1200.

4.6.2 Citoquímica ultraestrutural:

a) Técnica do ácido fosfotúngstico (PTA): as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por no mínimo 1 horas. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão e então incubadas por 2 horas em uma solução 2% de ácido fosfotúngstico diluído em

etanol absoluto. A desidratação foi feita em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e duas vezes de 100%) - 10 minutos em cada etapa. A infiltração e a inclusão foram feitas em resina Polybed, como anteriormente descrito. Após a obtenção dos cortes ultrafinos por ultramicrotomia, o material foi contrastado com acetato de uranila 5% por apenas 5 minutos e com citrato de chumbo por 5 minutos para posterior visualização em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 ou Zeiss 900. A preparação da amostra através desta técnica detecta proteínas básicas ricas em histidina (Souto-Padrón & DeSouza, 1978, 1979).

b) Técnica da prata amoniacal para a identificação de proteínas básicas: as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por no mínimo 1 hora e lavadas em água destilada. As células foram então incubadas por 5 minutos em uma solução de prata amoniacal. Esta solução é obtida a partir da adição gradual de nitrato de prata 10% ao hidróxido de amônio concentrado até que a solução torne-se ligeiramente turva. Após incubação, as células foram lavadas em água destilada e fixadas por 3 minutos em uma solução de formaldeído 3%. O material foi em seguida pós-fixado por 1h em solução contendo tetróxido de ósmio (OsO_4) 1%, ferrocianeto de potássio ($\text{K}_1\text{Fe}(\text{Cn})_6$) 0,8% e cloreto de cálcio 5mM, diluídos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, a temperatura ambiente. A desidratação, a infiltração e a inclusão foram feitas como descrito anteriormente. A preparação da amostra através desta técnica detecta proteínas básicas ricas em arginina e lisina (MacRae & Meetz, 1970; Souto-Padrón & DeSouza, 1978).

c) Identificação de ácidos nucléicos com uranila 0,42%: as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por no mínimo 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e duas vezes de 100%) - 10 minutos em cada etapa. A infiltração e a inclusão foram feitas em resina Polybed, como descrito anteriormente. Após a ultramicrotomia, os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 0,42% diluído em água por 30 minutos e com citrato de chumbo por 5 minutos. Cabe mencionar que a contrastação de materiais biológicos com concentrações de até 0,42% revela ácidos nucléicos de modo seletivo. Já as soluções aquosas com maior concentração de uranila (> 0,42%) e as soluções alcóolicas, contrastam proteínas e outros componentes celulares. As grades foram visualizadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 ou Zeiss 900.

4.6.3. Imunocitoquímica Ultraestrutural para a detecção de DNA

Técnica da terminal desoxinucleotidil transferase (TdT): com o intuito de observar a distribuição do DNA no cinetoplasto das células tratadas com a acriflavina, foi utilizada a técnica da terminal desoxinucleotidil 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 µM de 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), 125 U/ml de TdT e 4 µM de cada uma das 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-mouse IgG na proporção de 1:40 acoplado a partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro (Motta *et al.*, 2003).

4.7 Consumo de O₂:

O consumo de O₂ de formas epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis* tratados e não tratados com acriflavina foi medido por respirometria de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K, Instruments, Innsbruck), conforme especificações dos fabricantes.

Epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivados em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para *B. culicis*, o crescimento foi feito em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ambas as culturas foram acondicionadas em estufa a 28^o C. A droga foi adicionada após 12 horas (*B. culicis*) ou 24 horas (epimastigotas de *T. cruzi*) de cultivo em diferentes concentrações (5,10, 25 e 50µg.ml⁻¹). Após 24 horas de adição da droga e antes das medições, as células foram lavadas duas vezes no próprio meio de cultura para a retirada do soro fetal bovino e da droga que se encontrava presente. Uma alíquota das células foi retirada para contagem, sendo diluídas para uma concentração final de 10⁷ células.ml⁻¹. Para normalizar a leitura do equipamento, foi utilizado o mesmo meio de cultura usado para o crescimento celular dos protozoários.

4.8 Análises gráficas e estatísticas

Os gráficos e análises estatísticas foram plotados no programa Prim 5 da Graphpad. Para as análises comparativas, foi utilizado o teste múltiplo de comparação de Tukey.

5 Resultados

**“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que,
quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.”**

Thomas Jefferson

5.1 Proliferação celular:

As curvas de proliferação celular revelaram um efeito inibitório dose-dependente após o tratamento com a acriflavina, tanto em *Blastocrithidia culicis* como em *Trypanosoma cruzi*. *B. culicis* se mostrou mais afetada por concentrações mais baixas da droga do que os epimastigotas do *T. cruzi*. No entanto, estes últimos se mostraram mais vulneráveis às altas concentrações da droga. As curvas de proliferação celular revelaram também que em ambos protozoários, o efeito mais acentuado da droga no crescimento, começa a ser observado após 48 horas de tratamento (Figs. 19 e 20).

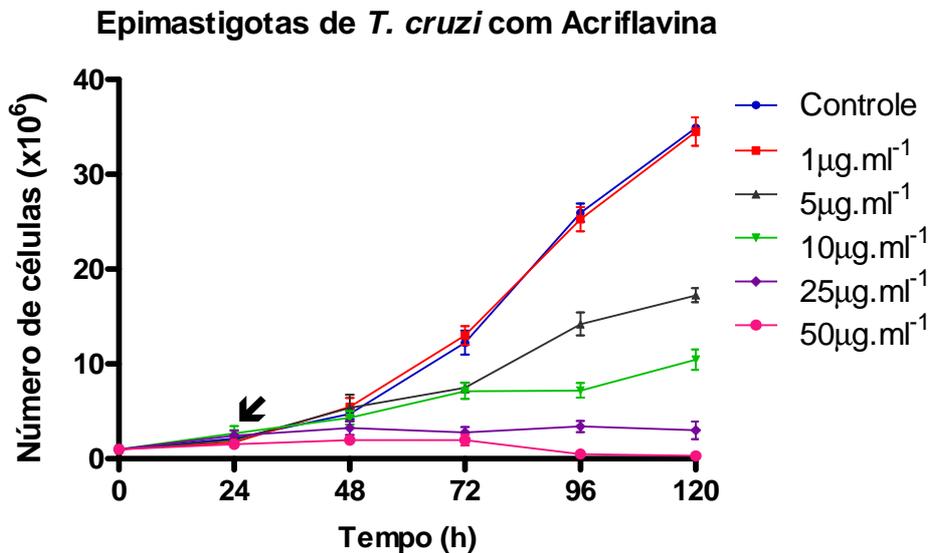


Figura 19: Curva de proliferação celular de epimastigotas de *T. cruzi*. A seta indica o momento em que a droga foi adicionada ao meio de cultura.

B. culicis com Acriflavina

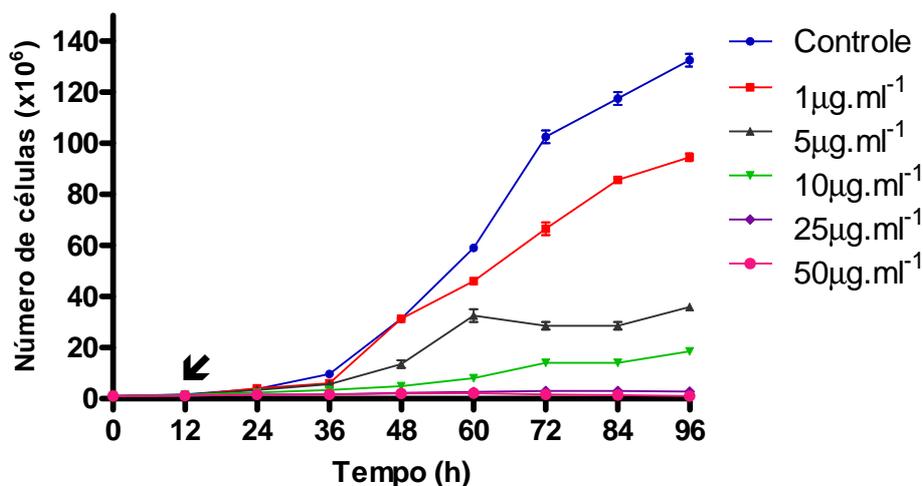


Figura 20: Curva de proliferação celular de *B. culicis*. A seta indica o momento em que a droga foi adicionada ao meio de cultura.

5.2. Microscopia eletrônica de transmissão de rotina:

As análises feitas por microscopia eletrônica de transmissão revelaram efeitos semelhantes na ultraestrutura dos epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis* após tratamento com a acriflavina.

Nos epimastigotas de *T. cruzi* baixas concentrações de acriflavina (1 µg.ml⁻¹, 72h) revelaram aumento da compactação da rede de kDNA em relação as células controle (comparar Figs 21 a-c). Também foi possível observar a presença de uma estrutura arredondada e eletrondensa próxima a região do sítio anti-podal (Fig. 21 d)

Com o aumento da concentração de acriflavina (50 µg.ml⁻¹, 48h), é possível notar que as alterações no kDNA se tornaram mais drásticas. Parte da rede apresenta compactação inalterada, no entanto começam a surgir porções de material com eletrondensidade diferenciada nas extremidades da

rede de kDNA, que podem variar quanto ao seu grau de compactação (Figura 22 a-d, seta branca). Deste modo, certas regiões podem se apresentar eletrondensas e com uma leve fragmentação (Fig. 22 c – seta branca da esquerda) ou mesmo com aparência menos eletrondensa e com arranjo fibrilar menos compacto em relação à rede do kDNA (Figuras 22 c - seta branca da direita). Após o tratamento dos epimastigotas de *T. cruzi* com $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 48 horas, o cinetoplasto, pode apresentar a rede em completa desorganização em relação ao arranjo característico (Figuras 22 d-e). Além das alterações observadas no cinetoplasto, o inchaço mitocondrial e a intensa vacuolização puderam ser notados em epimastigotas tratados com $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 48 horas (Fig.22 f). Não foram observadas alterações no núcleo, nem no citoesqueleto das células tratadas.

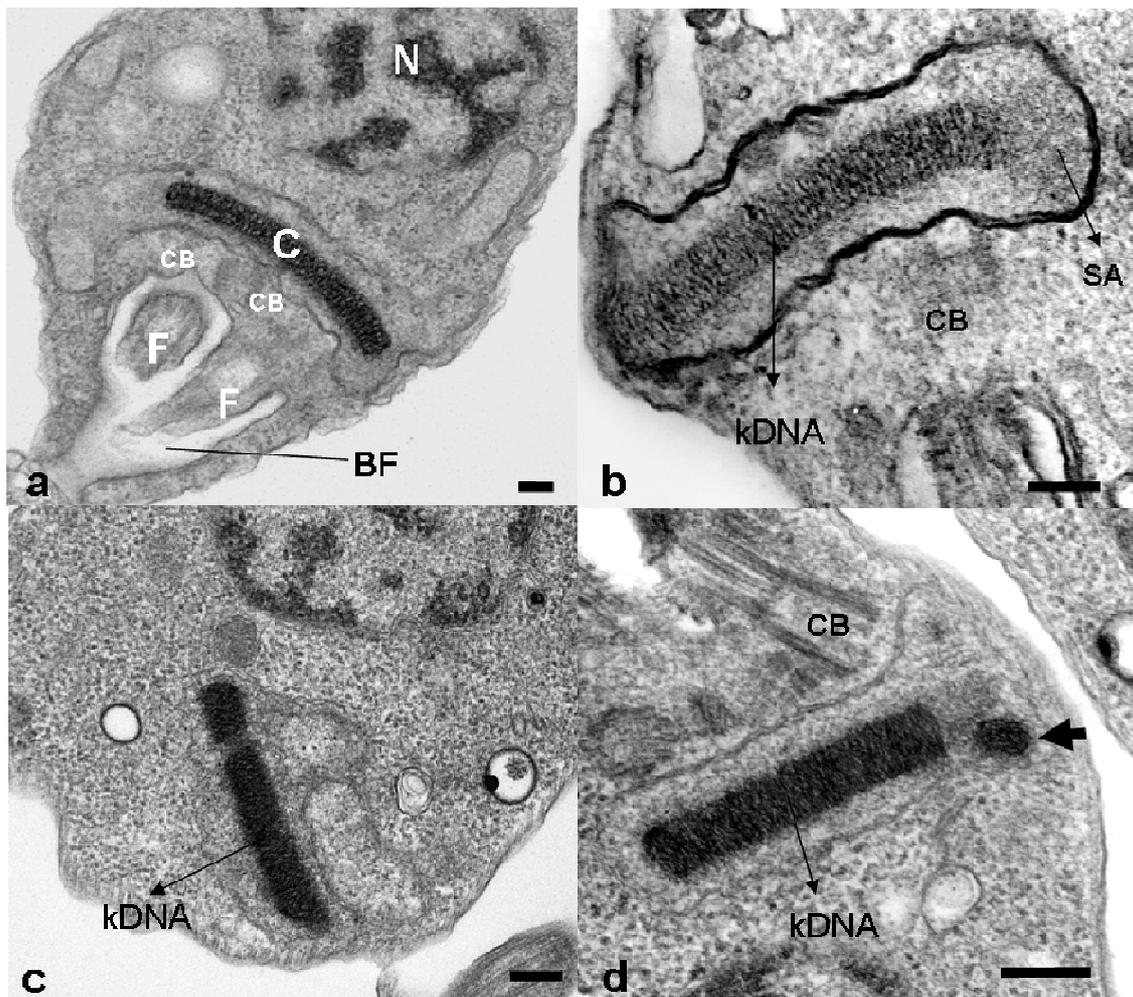


Figura 21: Ultraestrutura celular observada por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi* tratados ou não tratados (controle) com baixa concentração de acriflavina.

a – Epimastigota de *T. cruzi* controle, mostrando as estruturas típicas dos tripanosomatídeos.

b – Cinetoplasto de um epimastigota de *T. cruzi* não tratado.

c – Célula tratada com $1\mu\text{g.ml}^{-1}$, 72h. Notar que há um ligeiro aumento de compactação da rede de kDNA em relação ao controle

d – Epimastigota de *T. cruzi* tratado com $1\mu\text{g.ml}^{-1}$, 72h. A seta indica estrutura arredondada e eletrondensa atípica

BF = Bolsa Flagelar, C = Cinetoplasto, CB = Corpo basal, F = flagelo, N = núcleo, SA = Sítios antipodais. Barras = $0,25\mu\text{m}$.

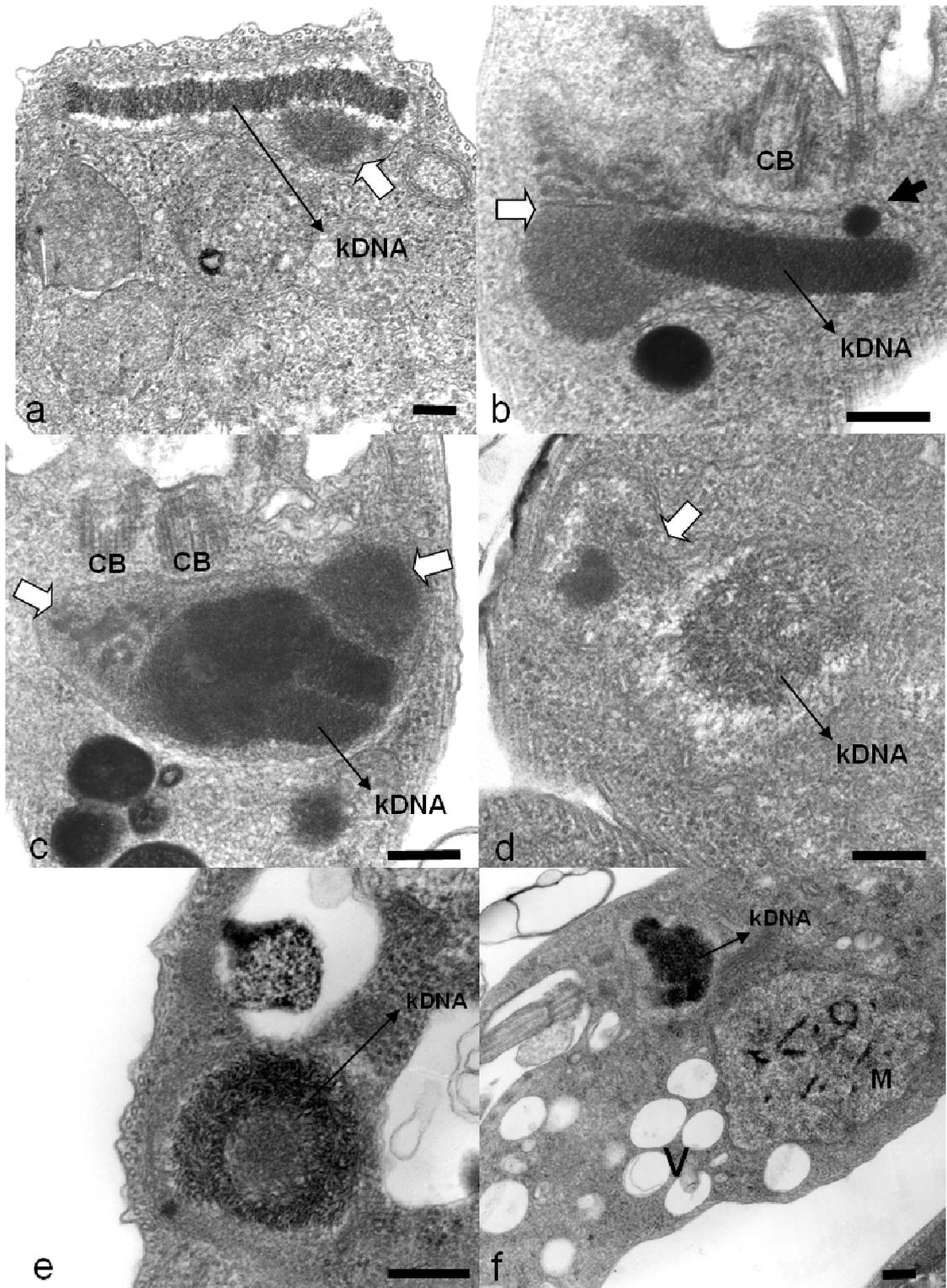


Figura 22: Epimastigotas de *T. cruzi* tratados com concentrações elevadas de acriflavina.

a-f - Protozoário tratado com $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 48h.

As setas brancas indicam porções diferenciadas do kDNA que apresentam compactação variada quanto à organização da rede.

CB = Corpo basal, M = Mitocôndria, V = Vesículas, Barras = $0,25\mu\text{m}$.

O tratamento de *B. culicis* com acriflavina revelou alterações na rede do kDNA e na ultraestrutura da mitocôndria. Os protozoários tratados com $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, por 24 horas, apresentaram perda do arranjo fibrilar característico do kDNA, além de uma leve compactação da rede, quando comparados a células controle. Além destes efeitos, também foi observado inchaço da mitocôndria e de suas cristas (Figs. 23 a-b). No entanto, semelhante ao ocorrido com epimastigotas de *T. cruzi*, observamos após o tratamento com acriflavina, porções diferenciadas da rede de kDNA quanto à compactação. Deste modo, uma intensa condensação na porção central da rede de kDNA pode ser notada, porém observamos a perda gradual da eletrondensidade em direção à periferia da rede (Fig. 23c, setas brancas). Após tratamento de *B. culicis* com 10 e $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 24 horas observamos uma maior descompactação da rede de kDNA. A presença de regiões da rede contendo graus de compactação e eletrondensidade diferenciadas, também foi observada. O arranjo fibrilar ainda está presente, porém este se mostra de modo cada vez menos compacto (Figs. 24 a-b, setas brancas). Além destes efeitos, um intenso inchaço mitocondrial também foi observado (Fig. 24 c). O tratamento com a concentração de $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48 horas, evidenciou uma rede de kDNA completamente desarranjada, no entanto, o arranjo fibrilar ainda se encontrava presente, ainda que de modo não uniforme (Fig. 24 d).

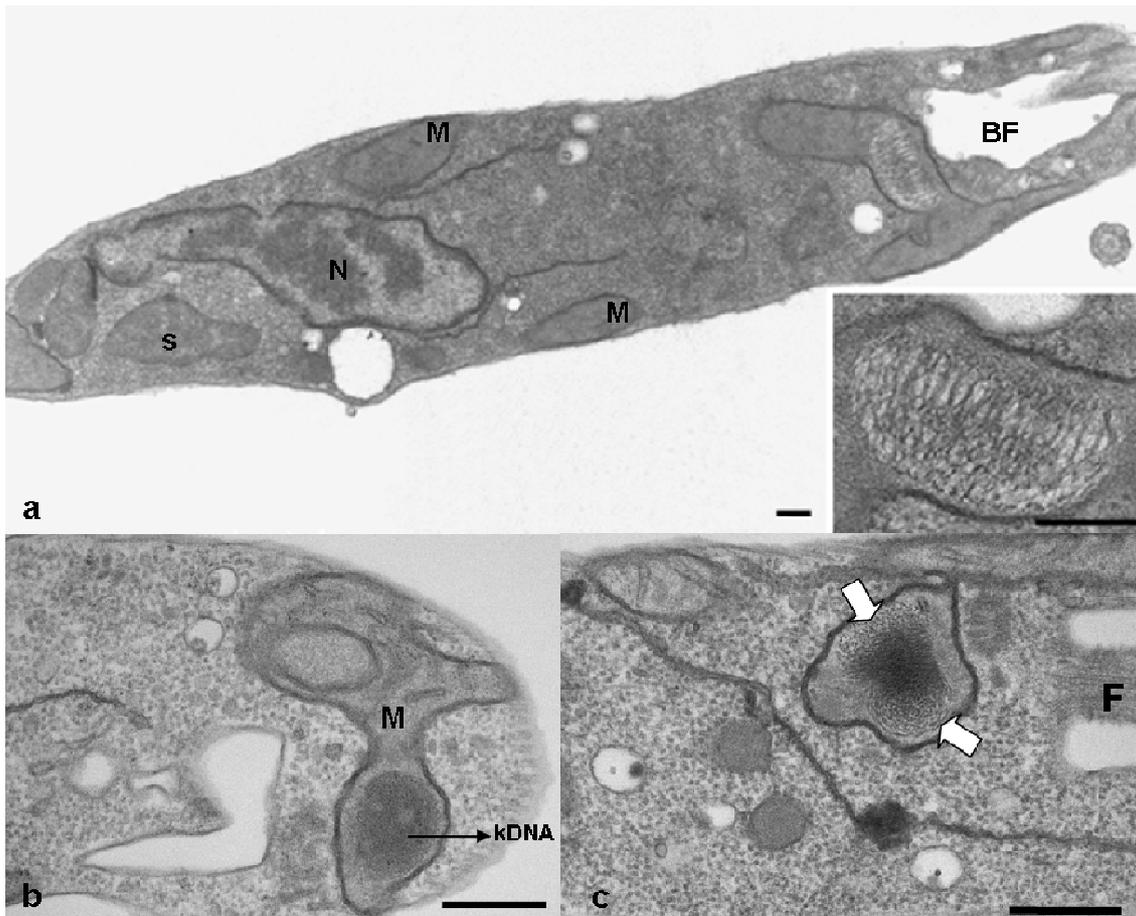


Figura 23: Ultraestrutura celular observada por microscopia eletrônica de transmissão de *B. culicis* tratada ou não tratada (controle) com baixa concentração de acriflavina. a - Célula controle onde observamos além de estruturas típicas como o núcleo e a mitocôndria ramificada, a presença da bactéria simbiótica (S). *Inset*: Observar no cinetoplasto o arranjo mais largo e frouxo da rede de kDNA b-c - Protozoários tratados com $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 24h. b - Notar a compactação alterada do kDNA e a presença de uma mitocôndria inchada com cristas alargadas. c - Observar a mudança de compactação do kDNA. As setas brancas indicam porções diferenciadas da rede onde a condensação é menor em relação à região central. N = núcleo, S = simbiote, BF = Bolsa flagelar, M = Mitocôndria, F = Flagelo. Barras = $0,25\mu\text{m}$.

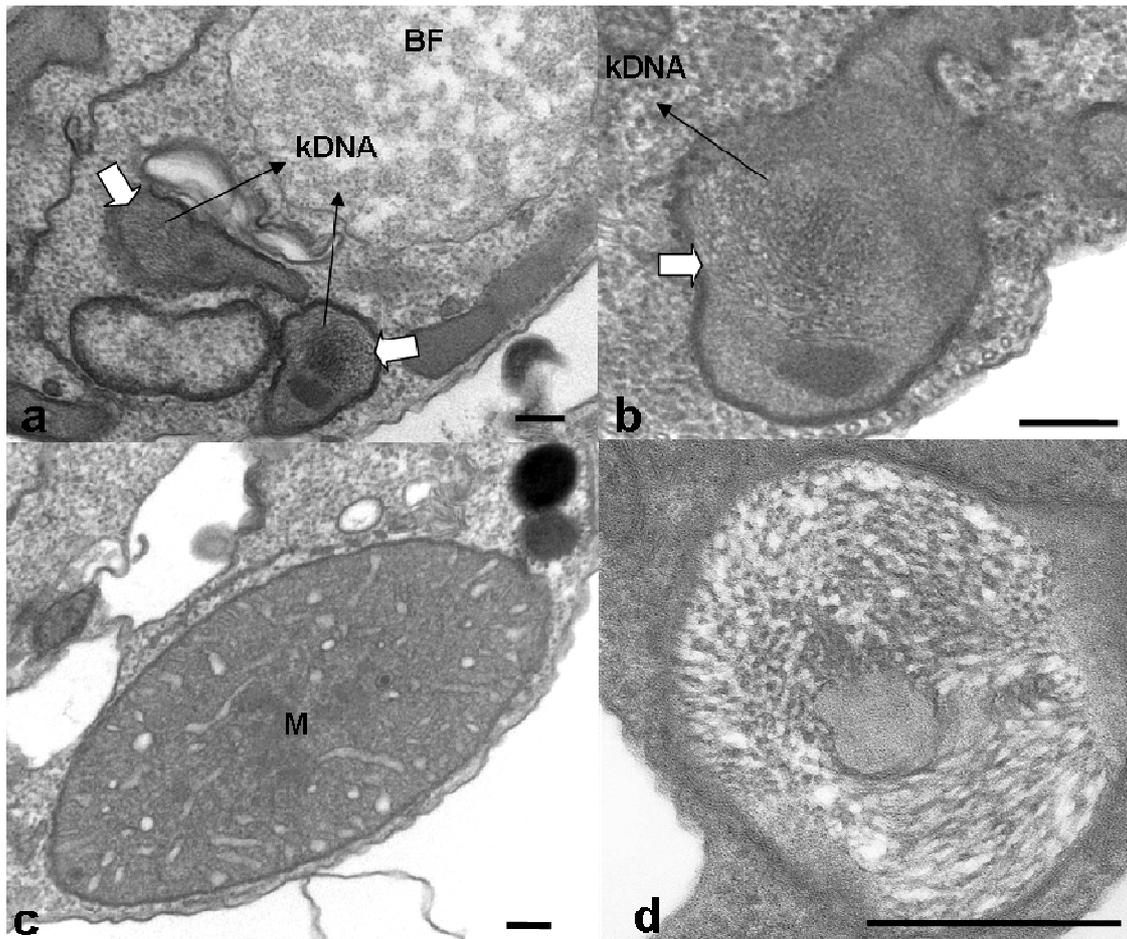


Figura 24: Ultraestrutura de *B. culicis* tratada com concentrações elevadas de acriflavina.

a – Célula tratada com $10\mu\text{g.ml}^{-1}$, 24h. Notar as alterações na compactação da rede de kDNA

b e c – Protozoários tratados com $25\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 24h. Notar a perda de compactação do kDNA (b) e o intenso inchaço mitocondrial (c)

d – *B. culicis* tratada com $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 48h. Observar o arranjo fibrilar heterogêneo da rede de kDNA.

As setas brancas indicam regiões do kDNA com compactação menos intensa.

BF = Bolsa flagelar, M = Mitocôndria, Barras = $0,25\mu\text{m}$.

De acordo com as observações feitas por microscopia eletrônica de transmissão, o arranjo do cinetoplasto de epimastigotas de *T. cruzi* mostrou-se mais apto para a observação das alterações e posterior avaliação dos efeitos ultraestruturais da acriflavina. Isto porque, o cinetoplasto de *B. culicis* apresenta uma topologia mais arredondada e mesmo após o tratamento, a forma geral da estrutura é mantida, diferentemente do que acontece em epimastigotas de *T. cruzi*. Neste último caso, o formato em barra é perdido após o tratamento e a rede toma diversas outras formas que auxiliam a detecção de alterações no arranjo do kDNA e na compreensão dos efeitos provocados pela droga. Deste modo, optamos por realizar as técnicas citoquímicas unicamente com a forma epimastigota de *T. cruzi*.

5.3 Citoquímica ultraestrutural:

5.3.1 Detecção de proteínas básicas utilizando a técnica do PTA: Análises

por microscopia eletrônica de transmissão de protozoários submetidos à técnica do ácido fosfotúngstico revelaram a marcação no núcleo e de todo o cinetoplasto, sugerindo a presença de proteínas básicas associadas às fibras de kDNA. É interessante notar também uma discreta marcação na região equivalente à zona cinetoflagelar (KFZ – Fig. 25 a). Nos protozoários tratados com acriflavina $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48 horas, observamos uma marcação ao longo da rede de kDNA alterada, sendo que esta é mais forte na periferia da rede (Fig. 25 b). Notamos também, que nos sítios com compactação diferenciada da rede de kDNA, a marcação é menos evidente (Fig. 28 b, seta branca).

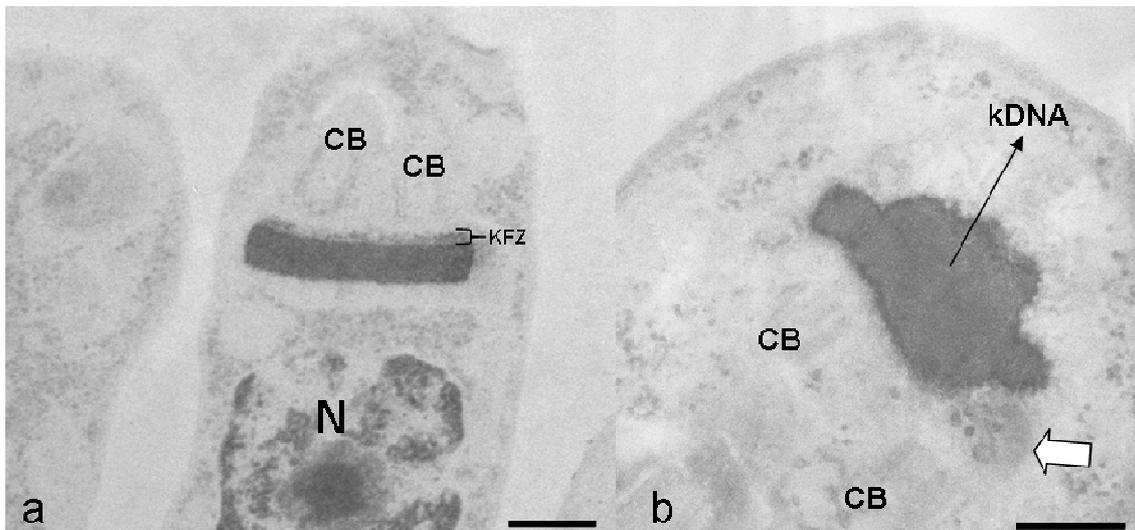


Figura 25 - Técnica de detecção de proteínas básicas ricas em arginina e lisina utilizando a técnica do PTA em epimastigotas de *T. cruzi*.

a - Protozoário não tratado (controle). Notar marcação no núcleo e na rede do kDNA, inclusive na zona KFZ

b - Célula tratada com acriflavina $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48h. A rede de kDNA tem arranjo alterado e está marcada, entretanto os sítios com compactação diferenciada mostram marcação menos evidente (seta branca).

CB = corpo basal, N = núcleo, KFZ = Kinetoflagelar Zone (Zona cineto-flagelar). Barras = $0,25\mu\text{m}$.

5.3.2 Detecção de proteínas básicas utilizando a técnica da prata amoniaca: Em protozoários controle, as análises por microscopia eletrônica, após a aplicação da técnica da prata amoniaca, revelaram marcação em regiões mais compactas e eletrondensas da rede de kDNA. Observamos também, uma marcação específica na região da zona cinetoflagelar, mais especificamente nos sítios de ligação cinetoplasto-corpo basal (Fig. 26 a, seta preta pequena). Nos protozoários tratados com acriflavina $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 48 horas, notamos que a marcação se estendeu por toda a rede do kDNA, que mostrou arranjo completamente alterado (Fig. 26 b-d). A marcação concentrou-se na região mais central da rede (Fig. 26 b), próxima à periferia (Fig. 26 c) ou mesmo nas regiões de compactação diferenciada, ainda que de modo bem menos intenso (Fig. 26 d, seta branca).

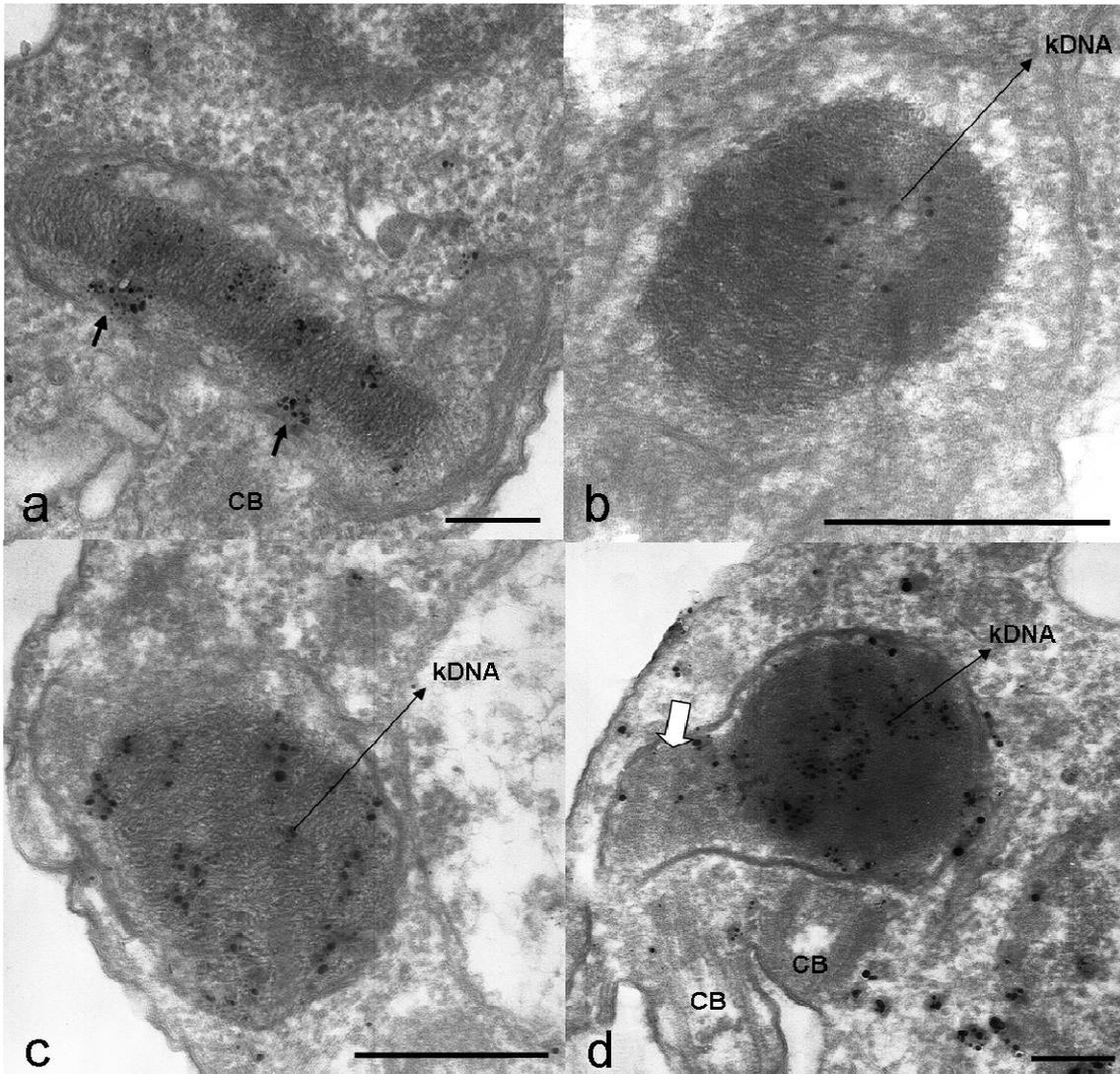


Figura 26 - Técnica de detecção de proteínas básicas ricas em histidina, utilizando a técnica da prata amoniacal em epimastigotas de *T. cruzi*.

a - Célula não tratada (controle). Notar marcação nas regiões mais eletrondensas da rede, inclusive nos sítios de ligação cinetoplasto-corpo basal.

b - d - Protozoário tratado com acriflavina $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48h. A marcação foi observada em diversos pontos da rede de kDNA, como na região central (b), periférica (c) e mesmo na região com compactação diferenciada (d, seta branca).

CB = corpo basal. Barras = $0,25\ \mu\text{m}$.

5.3.3 Detecção de ácidos nucléicos utilizando acetato de uranila

0,42%: Análises por microscopia eletrônica de transmissão utilizando a incubação de cortes ultrafinos com uranila 0,42% permitiram a detecção dos ácidos nucléicos no cinetoplasto, mostrando que estes compõem a rede do kDNA (figura 27a). Após o tratamento com acriflavina, ainda observamos marcação na rede, especialmente em sua periferia. Nos sítios onde ocorre o desarranjo do kDNA, a marcação se mostrou mais discreta (figura 27b-seta branca).

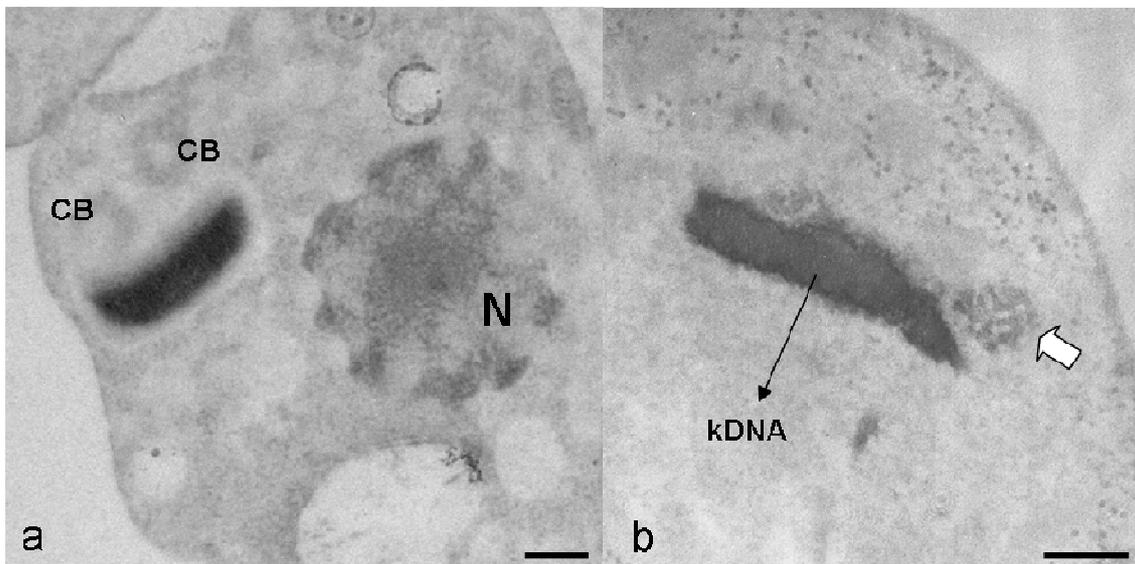


Figura 27: Citoquímica ultraestrutural utilizando uranila 0,42% para a detecção de ácidos nucléicos.

a – Epimastigota de *T. cruzi* não tratado com acriflavina.

b – Célula tratada com $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48h. Notar que a marcação é mais intensa na periferia da rede. A seta branca indica região com compactação diferenciada da rede de kDNA onde a marcação é mais discreta.

CB = Corpo basal, N = núcleo. Barras = $0,25\ \mu\text{m}$.

5.3.4 Detecção de DNA utilizando a técnica do TdT: A técnica do TdT é específica e bastante sensível para a detecção de DNA. Ela foi utilizada para determinar a composição das regiões com eletrondensidade diferenciada na rede de kDNA após o tratamento com acriflavina. Deste modo, em células não tratadas de epimastigotas de *T. cruzi*, observamos marcação ao longo da rede de kDNA. Também foi possível observar partículas de ouro na região da zona cinetoflagelar (KFZ), no entanto, esta se apresentava pontual e mais discreta. O núcleo também foi marcado, especialmente na região de heterocromatina junto ao envoltório nuclear (Fig. 28 a). Nos protozoários tratados com $5\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 48 horas, foi observada marcação na rede compactada pela ação da droga (Figura 28 b). No entanto, as porções que apresentam compactação diferenciada daquela observada na rede de kDNA, mostram ausência de marcação (Figura 28 c e 28 d, setas brancas).

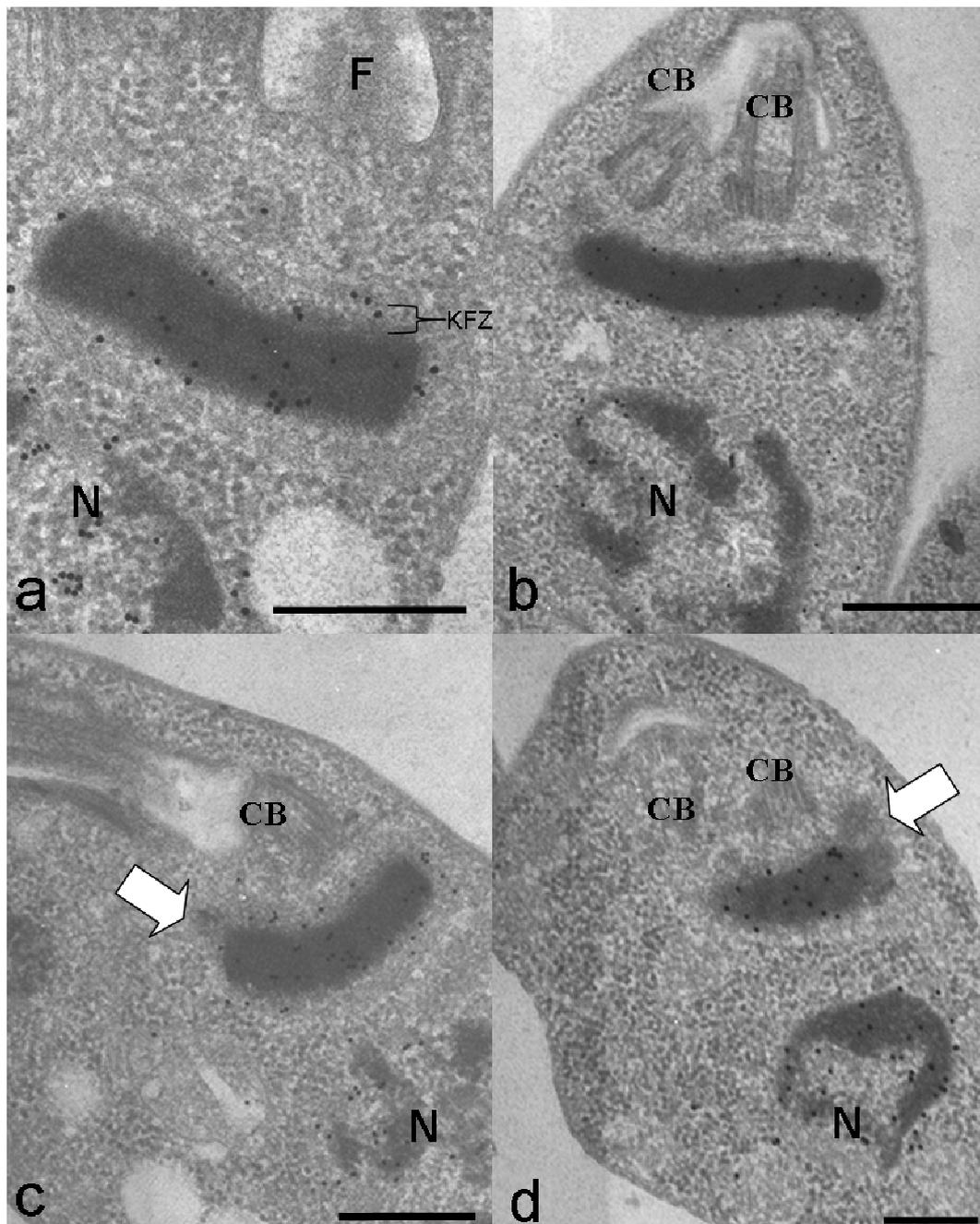


Figura 28: Citoquímica ultraestrutural utilizando a técnica do TdT, que é específica para a detecção de DNA.

a – Célula não tratada. Notar a marcação no núcleo e na rede de kDNA, inclusive na região KFZ.

b – d – Epimastigotas de *T. cruzi* tratados com $5\mu\text{g.ml}^{-1}$, 48h. Notar a marcação da rede condensada de kDNA (b) e a ausência de partículas de ouro nas porções de compactação diferenciada em relação à rede de kDNA (setas brancas).

F = Flagelo, CB = Corpo basal, KFZ = Kinetoflagelar Zone (Zona cineto-flagelar).

N = núcleo. Barras = $0,25\ \mu\text{m}$.

5.4 Técnica do Panótico Rápido observada por microscopia óptica de campo claro: Para a identificação de células discinetoplásticas utilizamos a técnica do Panótico Rápido, que marca compartimentos que contêm DNA, como o núcleo e o cinetoplasto. Em protozoários que não foram submetidos ao tratamento com acriflavina, a marcação mostrou-se forte no cinetoplasto e mais discreta no núcleo. Nestas células, é evidente o formato mais alongado e em forma de barra do cinetoplasto presente nos epimastigotas de *T. cruzi* (Fig. 29 a).

Nos protozoários tratados com acriflavina $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48 horas, observamos a presença de células discinetoplásticas, já que não é possível notar a marcação característica do cinetoplasto (Fig. 29 b, setas pretas). Outros fenômenos puderam ser evidenciados com esta técnica como a perda de conformação do cinetoplasto, que se mostrou arredondado em algumas células (Fig. 29 b-c, setas vermelhas). Além disso, notamos que protozoários em fase final da citocinese podem apresentar uma célula filha carregando um cinetoplasto com característica arredondada e a outra célula filha sem cinetoplasto (Fig. 29 d, seta azul).

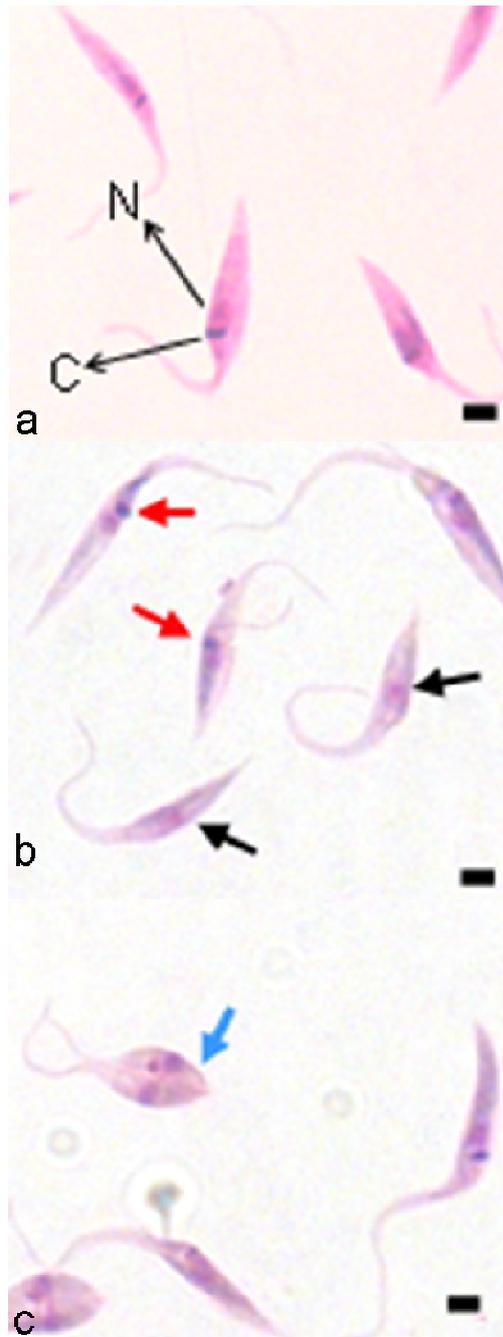


Figura 29: Técnica do Panótico Rápido observada por microscopia óptica de campo claro aplicada em epimastigotas de *T. cruzi*.
 a – Protozoários controle, onde são observados o núcleo (N) e o cinetoplasto (C) em forma de barra.
 b e c – Células tratadas com acriflavina $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 48 horas. Notar que há células discinetoplásticas (DC) (setas pretas), com cinetoplasto arredondado (setas vermelhas) e células em citocinese onde uma das células filhas é DC (seta azul).
 Barras = $3\mu\text{m}$.

5.5 Quantificação de protozoários discinetoplásticos em culturas tratadas

com acriflavina: Para avaliar o percentual de células discinetoplásticas (DC) presente em culturas de *B. culicis* e epimastigotas de *T. cruzi*, nós realizamos o tratamento dos protozoários por 24h em duas condições: com acriflavina $5\mu\text{g.ml}^{-1}$, que representa a mais baixa concentração capaz de promover o aparecimento de células DC; e com $50\mu\text{g.ml}^{-1}$, pois esta foi a maior concentração usada nos experimentos. Foi possível então observar, que em concentrações mais altas, houve aumento do número de células DC em ambas as espécies. No entanto, *B. culicis* apresentou maior percentual de células com este padrão quando comparada à *T. cruzi*. O valor é duas vezes maior para células tratadas com $5\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 24h e aproximadamente 1,35 para protozoários tratados com $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 24h (Fig. 30).

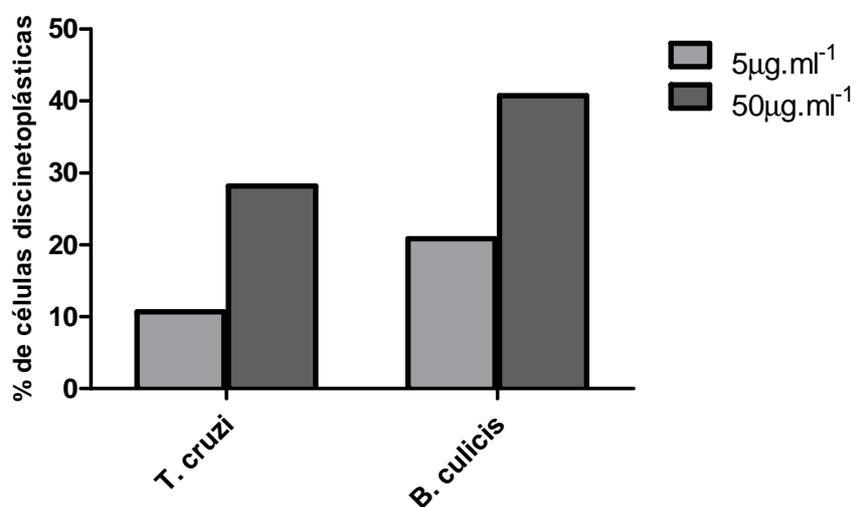


Figura 30: Quantificação de células discinetoplásticas após o tratamento com acriflavina 5 e $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 24h (n = 400 células).

5.6 Análise da ultraestrutura e proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* submetidos ao longo tratamento com acriflavina: Neste experimento, utilizamos apenas a forma epimastigota de *T. cruzi* que apresenta tempo de geração maior (24h) e é capaz de sobreviver por mais tempo quando mantida em estufa a 28 °C, se comparados a *B. culicis*, que possui tempo de geração menor (em torno de 12 h) e não sobrevive a vários dias sucessivos na estufa sem repique. Considerando estas diferentes condições de crescimento de cada espécie, perdemos o valor comparativo do experimento.

Os ensaios utilizando repiques sucessivos a cada 72h, quando era readicionada a droga na concentração de $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mostraram que 100% das células apresentavam o cinetoplasto alterado. Após 96 h de adição da droga, o kDNA destas células se apresentou fragmentado (Fig. 31 a). Uma grande parte da rede desaparece, indicando perda progressiva de kDNA após uma alteração completa de seu arranjo (Fig. 31 b). Após 168 h de tratamento os resultados são semelhantes, pois o kDNA mostra perda do seu arranjo típico e uma leve fragmentação (Fig. 31 c). Além destes efeitos, o inchaço mitocondrial também pode ser observado nos protozoários tratados (Fig. 31 d).

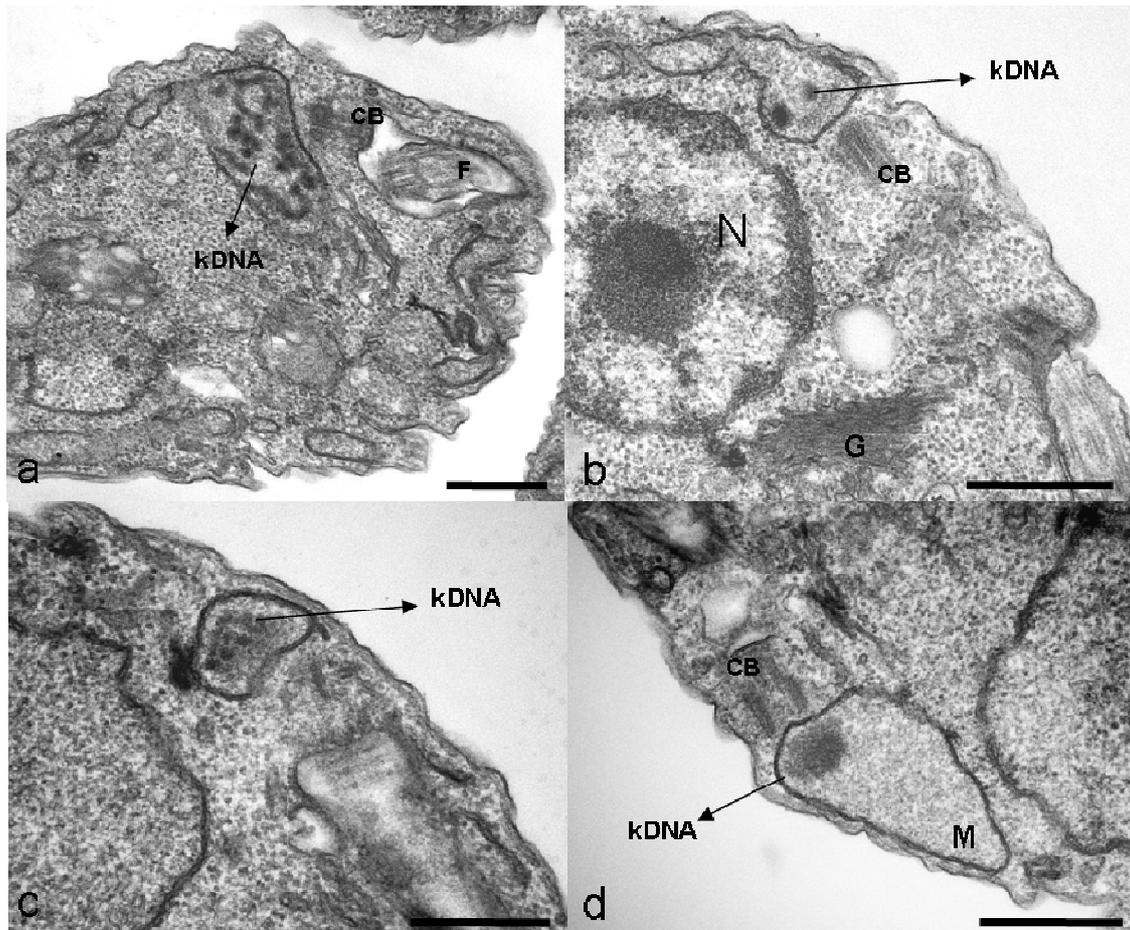


Figura 31: Epimastigotas de *T. cruzi* submetidos a tratamento mais longo com $5\mu\text{g.ml}^{-1}$ de acriflavina.

a e b – Células submetidas a 96h de tratamento. Notar a fragmentação (a) e a perda de grande parte (b) da rede de kDNA.

c e d – Protozoários submetidos a 168h de tratamento. Observar a fragmentação do kDNA (c), além do inchaço mitocondrial (d).

CB = Corpo Basal, F = Flagelo, G = Complexo de Golgi, N = Núcleo e M = Mitocôndria. Barras = $0,25\mu\text{m}$.

5.7 Quantificação de células discinetoplásticas do experimento de longo tratamento em epimastigotas de *T. cruzi*: A curva de proliferação celular com o tempo final estendido até 192 horas, revelou que ocorre decréscimo no número de células a partir do ponto de 120 horas (Figura 32). Além das 192 horas, não foram mais observadas células presentes no meio de cultura (dados não mostrados). A percentagem de células discinetoplásticas observadas após o tratamento com acriflavina $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nos tempos de 48, 120 e 192 horas foi similar (entre 55-60%), aumentando ligeiramente com o tempo mais longo de longo do tratamento (Fig. 33). Estas contagens foram feitas utilizando o método do Panótico Rápido. A avaliação da viabilidade celular utilizando azul de tripan 0,1% demonstrou que 100% das células permanece viável nos pontos de 48h, 120h e 196h (dados não mostrados).

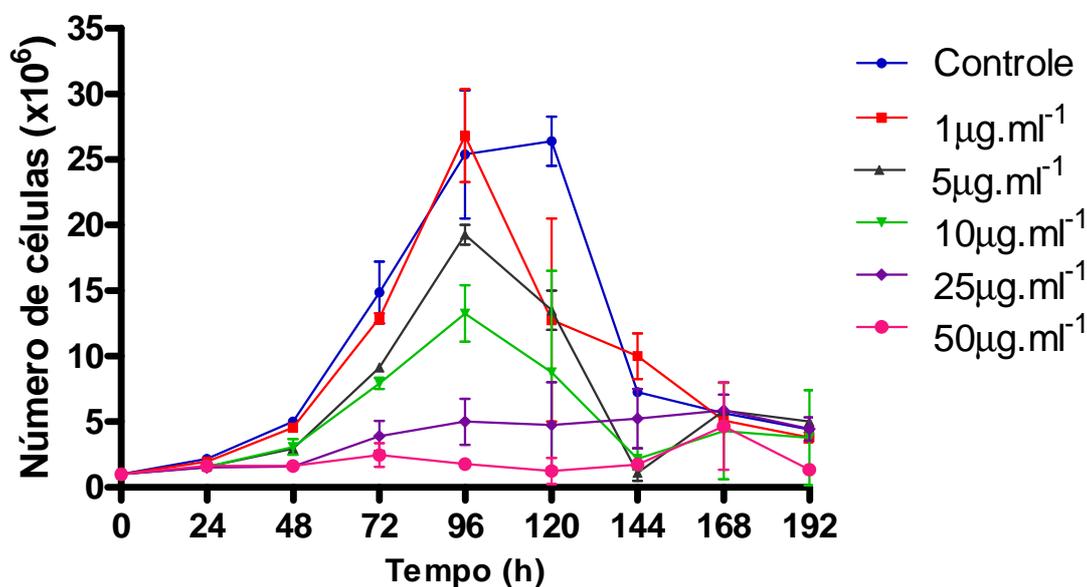


Figura 32: Curva de proliferação celular de epimastigotas de *T. cruzi* submetidos ao longo tratamento com acriflavina por até 192h.

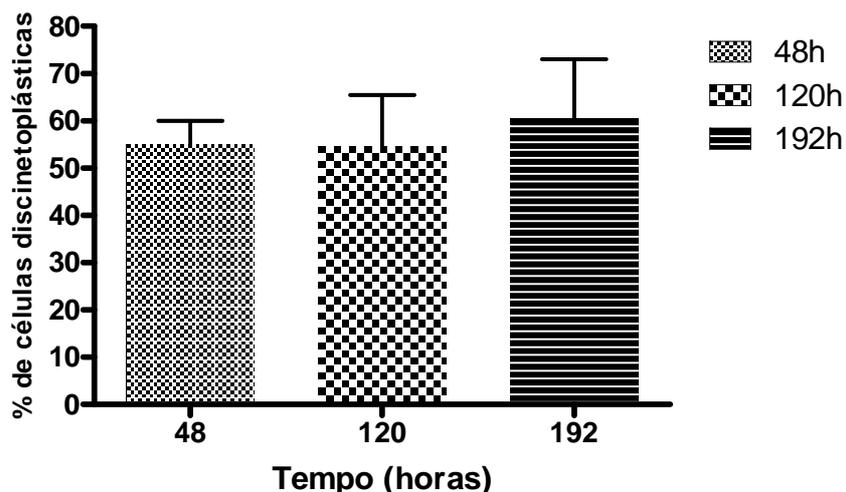


Figura 33: Porcentagem de células discinetoplásticas em epimastigotas de *T. cruzi* submetidos ao tratamento mais longo com acriflavina.

Em epimastigotas de *T. cruzi*, os efeitos ultraestruturais, assim como a presença do fenômeno de discinetoplastia encontram-se resumidos na tabela 6, para efeitos de comparação entre estes resultados.

Tabela 6: Efeitos da acriflavina na ultraestrutura de *T. cruzi*

Concentração ↓	Tempo →	24h	48h	72h	96h	120h	192h
1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$				- Compactação do kDNA			
5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$			- 10,67% de discinetoplastia			- Fragmentação da rede - Perda de parte da rede - 54,75% de discinetoplastia	- Fragmentação da rede - Inchaço mitocondrial - 60,5% de discinetoplastia
50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$			- Compactação do kDNA - Perda de arranjo fibrilar - Inchaço mitocondrial - 28,20% de discinetoplastia				

5.8 Medição do consumo de oxigênio: As medições do consumo de O_2 da forma epimastigota de *T. cruzi* mostraram efeito inibitório dose dependente após o tratamento por 24hs com acriflavina em diferentes concentrações (Figs. 33 e 34). As diferenças do consumo de O_2 entre o controle e a concentração de $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e a concentração de $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ mostraram-se significativas. Notar que as taxas de consumo de O_2 de *B. culicis* são maiores do que aquelas observadas para a forma epimastigota de *T. cruzi*. Entretanto tal consumo de O_2 não se dá de modo dose dependente, já que os protozoários tratados com as concentrações de 5 e $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, assim como as concentrações de 25 e $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de acriflavina, apresentam valores similares (Fig. 35 e 36). Isso pode ser observado através das análises estatísticas que revelaram que a diferença entre as concentrações de $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ não foram significativas.

Além disso, *B. culicis* mostrou um maior decréscimo da taxa de consumo de O_2 do que *T. cruzi* quando comparamos o percentual de inibição do consumo de O_2 das células tratadas com acriflavina em relação às células controle (comparar as Figs. 34 e 36).

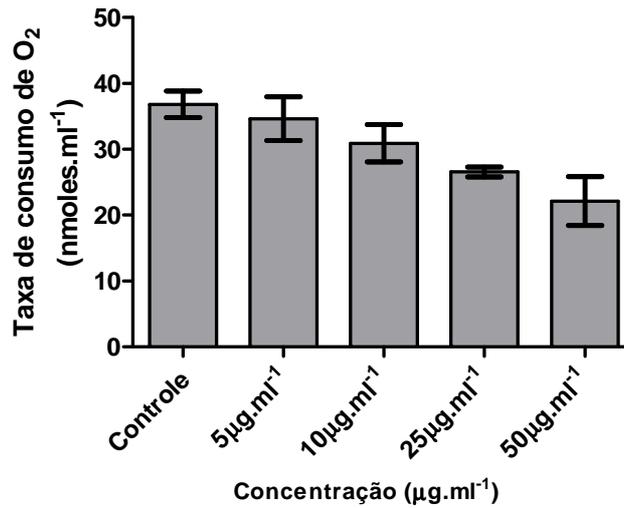


Figura 34: Consumo de oxigênio de epimastigotas de *T. cruzi* testado em células controle ou tratadas com 5,10, 25 e 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de acriflavina por 24 h.

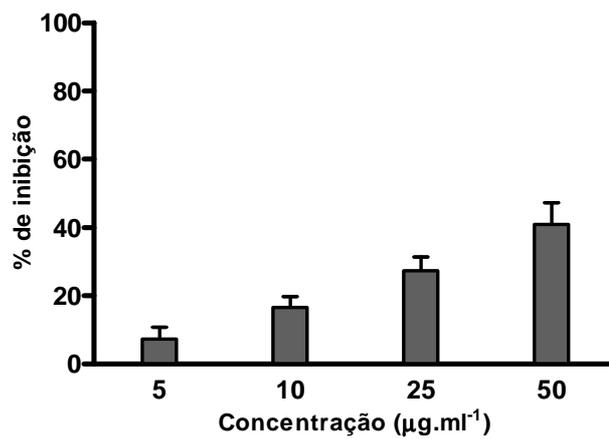


Figura 35: Percentual de inibição do consumo de oxigênio de epimastigotas de *T. cruzi* considerando cada concentração de droga utilizada em relação ao consumo de células não tratadas.

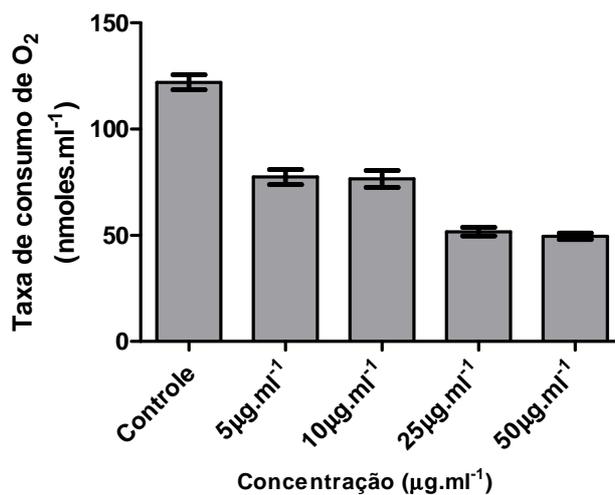


Figura 36: Consumo de oxigênio de *B. culicis* controle e tratado com 5,10, 25 e $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de acriflavina por 24 horas.

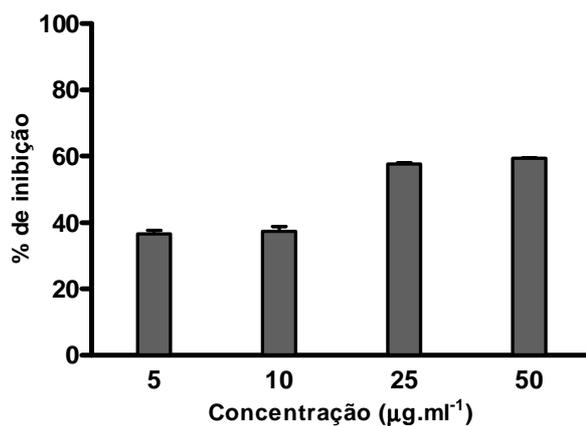


Figura 37: Inibição do consumo de oxigênio de *B. culicis* para cada concentração de droga utilizada em relação ao consumo de células não tratadas.

6 Discussão

**“Penso 99 vezes e nada descubro. Deixo de pensar,
mergulho no silêncio, e a verdade me é revelada.”**

Albert Einstein

Há diversas classes de compostos que vêm sendo pesquisados com a finalidade de encontrar melhores opções de tratamento para as enfermidades causadas por tripanosomatídeos como a Doença de Chagas e a leishmaniose. Tais quimioterápicos podem atuar, não apenas matando o parasito, mas também inibindo vias de biossíntese, alterando processos replicativos ou mesmo provocando a perda da funcionalidade de estruturas e/ou organelas (Vannier-Santos & De Castro, 2009; Rodrigues & De Souza, 2008; Lannes-Vieira *et al.*, 2010).

O cinetoplasto dos tripanosomatídeos representa uma estrutura única na natureza, por abrigar de maneira compacta, o DNA da mitocôndria (kDNA). Deste modo, a organização ímpar do cinetoplasto, assim como o complexo processo de replicação e segregação da rede de kDNA, torna esta estrutura um potencial alvo quimioterápico. A sensibilidade a drogas que atuam de modo direto ou indireto nestes processos tem sido reportada através do uso de compostos de diferentes classes como os inibidores de topoisomerasas, os agentes intercalantes e os ligantes que interagem com a cavidade menor da molécula de DNA (Das *et al.*, 2004; Motta, 2008).

Os estudos com a acriflavina, um agente intercalante de DNA, começaram, em tripanosomatídeos por volta da década de 1960. Há diversos relatos do uso desta droga em diferentes espécies de tripanosomatídeos patogênicos a mamíferos e até mesmo em monoxênicos (Trager & Rudzinska, 1964; Stuart, 1971; Bacchi & Hill, 1972; Riou *et al.*, 1980). A partir destes trabalhos, diversos efeitos foram descritos, principalmente alterações na estrutura da mitocôndria e no arranjo do kDNA destes protozoários. No entanto, a acriflavina jamais havia sido testada em *T. cruzi*, o agente etiológico da

doença de Chagas e em *B. culicis*, um protozoário monoxênico que abriga uma bactéria simbiótica em seu citoplasma. Entre essas diferentes espécies, encontramos arranjos diferentes do kDNA, tornando-os modelos interessantes para o estudo da organização, replicação e segregação do cinetoplasto de tripanosomatídeos.

Neste trabalho, observamos que um dos efeitos da acriflavina é promover um efeito dose-dependente na inibição da proliferação celular em tripanosomatídeos. Isto é válido para as formas epimastigotas de *T. cruzi* e *B. culicis*, principalmente para esta última espécie. A inibição da proliferação celular também já havia sido observada após o tratamento com acriflavina em *L. tarentolae* (Simpson, 1968), *C. fasciculata* (Hill & Anderson, 1969; Hajduk, 1979), *T. equiperdum* (Hajduk, 1979) e *T. brucei* (Agbe & Yielding, 1993). Estes resultados demonstram que esta droga é capaz de inibir a proliferação celular tanto em protozoários monoxênicos quanto em heteroxênicos que apresentam diferentes topologias da rede de kDNA. Além da acriflavina, o brometo de etídeo, também um agente intercalante de DNA, é capaz de promover a inibição da proliferação celular em *C. fasciculata* (Manaia & Roitman, 1977) e *T. brucei* (Agbe & Yielding, 1993).

Compostos que se ligam à cavidade menor do DNA como o berenil também apresentam atividade contra a proliferação de tripanosomatídeos, como em *T. brucei* (Agbe & Yielding, 1993) e epimastigotas de *T. cruzi* (Zuma, 2010). A distamicina, uma droga desta mesma classe, também inibiu o crescimento de *B. culicis* e de epimastigotas de *T. cruzi* (Zuma, 2010). As diamidinas aromáticas, compostos dicatiônicos, tiveram efeito tripanomicida nas formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (Da Silva *et al.*, 2010)

Além dos compostos já citados, diversos inibidores de topoisomerasas apresentaram efeito sobre a proliferação celular de tripanosomatídeos, como o ácido nalidíxico, um inibidor de Topo II de procariotos, que agiu em *B. culicis*, epimastigotas de *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *C. fasciculata* (Cavalcanti *et al.*, 2004). Inibidores de Topo I, como a camptotecina e a rebecamicina, também são capazes de impedir o crescimento celular de tripanosomatídeos, o que pode resultar em apoptose (Bodley & Shapiro, 1995b; Sen *et al.*, 2004; Deterding *et al.*, 2005). Juntos, estes dados indicam que os compostos que inibem a atividade de enzimas que participam da replicação do kDNA, seja de modo direto ou indireto, constituem importantes agentes quimioterápicos no tratamento de tripanosomíases e leishmanioses.

A microscopia eletrônica de transmissão foi uma excelente ferramenta para avaliar o efeito da acriflavina nas espécies de tripanosomatídeos analisados neste trabalho. De certa forma, os efeitos ultraestruturais notados em epimastigotas de *B. culicis* e *T. cruzi* foram semelhantes. O inchaço mitocondrial observado nestas duas espécies foi descrito de maneira semelhante em *L. tarentolae*, onde também foi possível notar a degeneração das cristas mitocondriais. Além disso, a descrição dos efeitos da acriflavina em *L. tarentolae* estão relacionados à perda do arranjo fibrilar do kDNA e à formação de uma região eletrondensa e difusa na rede (Trager & Rudzinska, 1964), como observado no presente trabalho. É importante notar, que não há relatos de alterações ultraestruturais no núcleo de tripanosomatídeos tratados com acriflavina. Já em *T. brucei*, o kDNA se mostrou alterado apresentando tanto o fenômeno de desarranjo como o de aumento da compactação (referido pelo autor como corpos densos), resultando na perda da conformação da rede

(Stuart, 1971). Resultados obtidos após o tratamento de *T. equiperdum* com acriflavina mostraram fragmentação da rede em diversas regiões, e foram referidas pelo autor como cinetoplasto alterado (Hajduk, 1979).

Em espécies de monoxênicos, as alterações ultraestruturais observadas após o tratamento com acriflavina, são similares as descritas em tripanosomatídeos heteroxênicos e patogênicos. Em *Crithidia luciliae*, foi observada uma intensa compactação do kDNA e também uma aparente redução do tamanho da rede após o tratamento com a acriflavina. A região fibrilar interna se mostrava bem compacta (Steinert & VanAssel, 1967). Em *C. fasciculata*, o tratamento com a droga revela uma intensa compactação da rede incluindo a perda do arranjo fibrilar. Neste caso, também foi possível observar porções diferenciadas da rede com uma parte dela mais compacta e outra com perda de eletrondensidade. Além disso, algumas micrografias revelaram uma aparente perda ou redução significativa da rede de kDNA (Hajduk, 1979). A mitocôndria apresentou o inchaço característico anteriormente observado em células tratadas com acriflavina (Hill & Anderson, 1969).

É interessante notar, que o uso de compostos ligantes que interagem com a cavidade menor da molécula de DNA, também promoveu alterações ultraestruturais em tripanosomatídeos. Na forma tripomastigota de *T. cruzi*, as diamidinas aromáticas provocaram a desorganização dos microtúbulos subpeliculares e daqueles que compõem o axonema, além de alterações na mitocôndria e no cinetoplasto, que apresentou o arranjo de kDNA bastante modificado (Batista *et al.*, 2010). Quando a forma epimastigota de *T. cruzi* foi tratada com berenil, o cinetoplasto apresentou regiões com menor eletrondensidade, tal como descrito no presente trabalho após o uso de

acriflavina. Além disso, foram observadas invaginações da membrana mitocondrial interna em direção a rede de kDNA (Zuma, 2010). Já *B. culicis*, após o tratamento com berenil ou distamicina, mostrou maior compactação das fibrilas de kDNA, como já descrito para tripanosomatídeos tratados com norfloxacina, enoxacina e ácido nalidíxico, compostos inibidores da Topo II (Zuma, 2010; Cavalcanti *et al.*, 2004). Estas diferentes alterações na rede podem estar relacionadas aos diferentes arranjos do kDNA apresentado por estes protozoários.

Há relatos na literatura mostrando que o cinetoplasto é o principal alvo de drogas que se ligam ao DNA (revisto por Das *et al.*, 2004 e Motta, 2008). A especificidade de ligação da acriflavina ao cinetoplasto tem sido relacionada à riqueza de sequências A-T (Guttman & Eisenman, 1965), mas também pode estar associada ao arranjo de círculos catenados que formam a rede de kDNA. É interessante observar que o efeito provocado na rede de kDNA após o tratamento com inibidores de topoisomerasas e também com drogas ligantes de DNA é similar ao descrito no presente estudo. Juntos, estes dados indicam que a inibição direta ou indireta da atividade de topoisomerasas promovem alterações na ultraestrutura da rede de kDNA dos tripanosomatídeos (Cavalcanti *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2010; Zuma, 2010).

As citoquímicas ultraestruturais utilizadas na detecção de proteínas básicas e de ácidos nucléicos, possibilitaram uma melhor compreensão sobre os efeitos da acriflavina na topologia da rede de k-DNA. A técnica do PTA e da prata amoniacal aplicadas em células controle revelaram a presença de proteínas básicas ao longo da rede de kDNA de epimastigotas de *T. cruzi*, como anteriormente observado por Souto-Padrón e DeSouza (1978). Neste

trabalho, observamos que após o tratamento com a acriflavina, a marcação se mantém no cinetoplasto, mesmo após a perda do arranjo do kDNA. Entretanto, nas regiões da rede que apresentaram redução de eletrondensidade, a marcação mostrou-se mais discreta. Estes dados indicam que a ação da acriflavina promove a redistribuição das proteínas básicas que estão associadas ao cinetoplasto, o que possivelmente, explica as mudanças conformacionais da rede de kDNA.

O uso da uranila a 0,42%, que detecta ácidos nucleicos como DNA e RNA, revelou uma marcação discreta na porção menos eletrondensa da rede de kDNA. Entretanto, a aplicação da técnica do TdT, que é altamente específica para detecção de DNA, não mostrou marcação nesta região da rede. Deste modo, podemos sugerir que estas regiões da rede que apresentam menor eletrondensidade, não correspondem a sítios contendo círculos de kDNA decatenados. Há relato de que o tratamento de *T. cruzi* com acriflavina pode gerar o acúmulo de RNAm (Coelho, 2001). É possível propôr que as regiões menos eletrondensas observadas por microscopia eletrônica de transmissão contêm RNA acumulado, entretanto novos ensaios citoquímicos e imunocitoquímicos serão necessários para confirmar esta hipótese. Além disso, outros efeitos promovidos pela acriflavina como a linearização dos minicírculos, foram descritos em *T. equiperdum*, sugerindo que a replicação dos minicírculos poderia estar comprometida (Riou *et al.*, 1980). De outro modo, foi proposto que o berenil evita a saída de minicírculos da rede o que também inibiria o processo replicativo do kDNA (Portugal, 1994).

Entre os efeitos provocados pela acriflavina, está a discinetoplastia. Este fenômeno era antigamente referido como acinetoplastia. No entanto, em 1964,

Trager & Rudzinska substituíram este termo e propuseram uma nova definição para ele. A discinetoplastia passou então a definir células com o arranjo de kDNA alterado, mas com a estrutura do cinetoplasto ainda presente. As evidências baseadas em microscopia eletrônica de transmissão suportam esta definição, pois mostram que a rede de kDNA ainda se encontra presente apesar do cinetoplasto não ser detectável após a coloração por Giemsa.

Partindo destas observações, utilizamos a coloração do Panótico Rápido, que funciona de modo semelhante ao Giemsa, para observar o efeito da acriflavina no cinetoplasto de protozoários tratados. Neste estudo, pudemos observar a presença de células discinetoplásticas tanto nas culturas de *B. culicis* como nas de *T. cruzi*, após o uso de uma concentração relativamente baixa de acriflavina ($5\mu\text{mL}^{-1}$). Nossos dados estão de acordo com aqueles observados em *L. tarentolae* (Trager & Ruszinska, 1964; Simpson, 1968), *C. luciliae* (Steinert & VanAssel, 1967), *T. brucei* (Stuart, 1971), *C. fasciculata* e *T. equiperdum* (Hajduk, 1979).

A quantificação do fenômeno de discinetoplastia revelou que este era maior em concentrações mais altas, sendo mais frequente em *B. culicis* do que em *T. cruzi*. Este dado reforça a idéia de que protozoários com arranjo mais frouxo da rede de kDNA são mais susceptíveis à ação de inibidores que têm como alvo o cinetoplasto. É importante ressaltar que nas micrografias obtidas pela técnica do Panótico Rápido, observamos que algumas células tratadas apresentavam a perda da forma em barra do cinetoplasto, que é típica dos epimastigotas de *T. cruzi*, e passaram a apresentar um formato mais arredondado. Além disso, pudemos observar que células em fase final de citocinese, apresentavam uma das células filhas com cinetoplasto arredondado

e a outra com características de discinetoplastia, como anteriormente descrito em *C. luciliae* (Steinert & VanAssel, 1967). Este dado indica que o surgimento de células discinetoplásticas ocorre após a fase de síntese (fase S). Isto porque, a acriflavina poderia promover alterações conformacionais da rede de modo que os círculos não pudessem ser liberados para posterior replicação e segregação de maneira igualitária entre as células filhas. Considerando estes resultados, surgiu a necessidade de saber se os tripanosomatídeos eram capazes de sobreviver por longo período em meio de cultura contendo acriflavina, gerando assim células discinetoplásticas (DC). Após 192 h (8 dias), não houve a possibilidade de continuar o experimento, pois todas as células morriam após este período na presença do intercalante. A quantificação das células DC nesta cultura revelou que a discinetoplastia aumentava discretamente com o decorrer do tempo, tendendo à estabilidade, tal como descrito em *L. tarentolae* (Simpson, 1968), *C. fasciculata* (Hill & Anderson, 1969; Hajduk, 1979) e *T. equiperdum* (Hajduk, 1979). Análises por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que nos tempos mais longos de tratamento com acriflavina (entre 96h e 192h), todos os cinetoplastos observados apresentavam mudanças conformacionais na rede de kDNA. Em alguns casos, a rede parecia ter reduzido de tamanho drasticamente, de modo semelhante ao descrito em *L. tarentolae* (Trager e Rudzinska, 1964) e em *C. luciliae* (Steinert & VanAssel, 1967). Foi interessante observar que o uso da concentração de $5\mu\text{ml}^{-1}$ gerou efeitos na topologia e conformação da rede de kDNA, indicando que as células seriam incapazes de sobreviver a um tratamento mais prolongado com concentrações mais altas de acriflavina.

Após relatar todas as alterações que foram observadas no cinetoplasto e na mitocôndria de células tratadas com acriflavina, surge a questão se o metabolismo mitocondrial estaria comprometido face ao intenso dano causado à topologia da rede de kDNA e a própria ultraestrutura da mitocôndria. Experimentos medindo a concentração de oxigênio mostraram que há um decréscimo dose dependente da taxa de consumo deste gás em meio de cultura contendo protozoários tratados com a acriflavina, quando estes são comparados ao controle. Tal resultado é similar ao obtido com *C. fasciculata* tratada com acriflavina (Hill & Anderson, 1969; Bacchi & Hill, 1972) e também após o uso de brometo de etídeo, outro intercalante de DNA (Maniaia e Roitman, 1977). Em *C. fasciculata*, além dos efeitos na respiração, foi detectada a redução da atividade de diversas enzimas mitocondriais (Bacchi & Hill, 1972). Estes resultados sugerem que danos provocados à estrutura da rede promovem efeitos no metabolismo energético da mitocôndria. A associação das alterações da rede de kDNA, à possível linearização de minicírculos, como foi observado em *T. equiperdum* (Shapiro *et al.*, 1989), poderia resultar no comprometimento da edição do RNAm proveniente dos maxicírculos, que possuem a informação das proteínas estruturais e funcionais da mitocôndria.

Juntas, estas observações completam a definição dada à discinetoplastia por Stuart em 1971, que considera três características essenciais: não há marcação por Giemsa no cinetoplasto, o arranjo fibrilar do kDNA se encontra alterado e as células são incapazes de se dividir em condições que requerem a respiração mitocondrial. Esta definição está de acordo com as nossas observações que mostram que o tratamento de

tripanosomatídeos com a acriflavina induz a discinetoplastia. Entretanto, o fenômeno da discinetoplastia também pode se apresentar de forma espontânea na natureza, como em *T. brucei* e em *T. equiperdum*. Entretanto, estes protozoários são capazes de sobreviver porque o metabolismo energético não é completamente dependente da respiração mitocondrial (Stuart, 1971; Hajduk, 1979 e revisto por Schnauffer *et al.*, 2002).

Concluindo, o conceito de discinetoplastia se resume na perda da marcação do cinetoplasto usando métodos de coloração como o Giemsa e o Panótico Rápido, para posterior observação por microscopia óptica. As alterações conformacionais na rede de kDNA também são detectáveis por microscopia eletrônica, após perda total ou parcial do DNA presente no cinetoplasto. É importante salientar que este conceito de discinetoplastia ainda não explora outros aspectos que começaram a ser estudados mais recentemente como a indução de apoptose por inibidores de DNA topoisomerase em *Leishmania* (Chowdhury *et al.*, 2003).

7 Conclusões

**"Uma experiência nunca é um fracasso, pois sempre
vem demonstrar algo."**

(Thomas Edison)

- A acriflavina promoveu efeito inibitório dose dependente na proliferação celular dos epimastigotas de *B. culicis* e *T. cruzi*.
- O tratamento com a droga revelou perda no arranjo, assim como alterações na topologia da rede de kDNA das duas espécies analisadas.
- Epimastigotas de *T. cruzi* não foram capazes de proliferar por mais de 192 horas em meio de cultura contendo acriflavina.
- Os tripanosomatídeos usados neste estudo apresentaram redução da taxa de consumo de oxigênio após o tratamento com a droga.
- O tratamento com acriflavina induziu ao aparecimento de células discinetoplásticas (DC) nas duas espécies utilizadas como modelo de estudo.
- O uso de agentes intercalantes, como a acriflavina, deve alterar o processo replicativo e a segregação do kDNA, pois gerou células discinetoplásticas, além de reduzir a proliferação celular.
- O uso de intercalantes é uma importante ferramenta para o estudo da topologia e replicação do kDNA.
- O cinetoplasto se mostra sensível ao tratamento com drogas que se ligam ao DNA, reforçando a idéia que esta estrutura representa um potencial alvo quimioterápico.

8 Referências

“O segredo da criatividade é saber como esconder as fontes.”

Albert Einstein

- AGBE, S. A. & YIELDING, K. L. Effect of verapamil on antitrypanosomal activity of drugs in mice. *Acta Trop.* 55: 11–19, 1993.
- ANDERSON W. & HILL G. C. Division and DNA synthesis in the kinetoplast of *Crithidia fasciculata*. *J. Cell Sci.* 4:611-620, 1969.
- BACCHI, C. J. & HILL, G. C. *Crithidia fasciculata*: Acriflavine-induced changes in soluble enzyme levels. *Exp. Parasitol.* 31: 290-298, 1972.
- BALANÍA-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.
- BATISTA, D. G. J.; PACHECO, M. G. O.; KUMAR, A.; BRANOWSKA, D.; ISMAIL, M. A.; HU, L.; BOYKIN, D. W. & SOEIRO, M. N. C. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 137:251–259, 2010.
- BEARDEN, D. T. & DANZIGER, L. H. Mechanism of action and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy* 21: 224S–232S, 2001.
- BISCARDI, A. M.; LOPEZ, L. M.; DEPAHN, E. M.; PELLEGRINO, D. I. & STOPPANI, A. O. Effect of dyskinetoplastic agents on ultrastructure and oxidative phosphorylation in *Crithidia fasciculata*. *Biocell* 25: 43–51, 2001.
- BODLEY, A. L.; WANI, M. C.; WALL, M. E. & SHAPIRO, T. A. Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. Structure–activity correlations. *Biochem. Pharmacol.* 50: 937–942, 1995a.
- BODLEY A. L. & SHAPIRO T. A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3726-3730, 1995b.
- 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.

BROXTERMAN, H. J. & GEORGOPAPADAKOU, N. Cancer research 2001: drug resistance, new targets and drug combinations. *Drug Resist. Updat.* 4: 197–209, 2001.

CAMARGO E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 6:93-100, 1964.

CARPENTER L. R. & ENGLUND P. T. Kinetoplast maxicircle DNA replication in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.* 15:6794-803, 1995.

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. Res.* 94: 439-448, 2004.

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 Biol.* 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.

CHAUDHURI, M., OTT, R. D. & HILL, G. C. Trypanosome alternative oxidase from molecule to function. *Trends Parasitol.* 22: 484-491, 2006.

CHOWDHURY A. R.; MANDAL S.; GOSWAMI A.; GHOSH M.; MANDAL L.; CHAKRABORTY D.; GANGULY A.; TRIPATHI G.; MUKHOPADHYAY S.; BANDYOPADHYAY S. & MAJUMDER H. K. Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II:

implications in antileishmanial therapy. *Mol. Med.* 9:26-36, 2003.

COELHO, E. R. Caracterização gênica e expressão de PDZ5, uma proteína com domínios dedo de zinco de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas –Biofísica), 2001.

CORRÊA-DA-SILVA, M. S., FAMPA, P., LESSA, L. P., SILVA, E. R., SANTOS, J. R. M., SARAIVA, E. M. & MOTTA, M. C. M. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiontbearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. *Parasitol. Res.* 99, 384–391, 2006.

CROFT S. L. & YARDLEY V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Curr. Pharmaceut. Des.* 8: 319-342, 2002

CUTHBERTSON, R. S. Kinetoplast DNA in *Trypanosoma equinum*. *J. Protozool.* 28: 182–188, 1981.

DAS, A; DASGUPTA, A; SENGUPTA, T & MAJUMDER, H.K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potencial chemotherapeutic targets. *Trends in Parasitol.* 20: 381-387, 2004.

DA SILVA C. F.; DA SILVA P. B.; BATISTA M. M.; DALIRY A.; TIDWELL R. R. & SOEIRO M. D. E N. The biological in vitro effect and selectivity of aromatic dicationic compounds on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105: 239-245, 2010.

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

DENNY, W. A. & BAGULEY, B. C. Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 339–353, 2003.

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

DE SOUZA, W. & MOTTA, M. C. M. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 1-8, 1999.

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

DE SOUZA, W. Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. Parasitol. Int. 56:161-170, 2007

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

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

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.

DOCAMPO R. & MORENO S. N. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. Curr. Drug Targets Infect. Disord. 1:51-61, 2001.

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.; DA CUNHA, J.P.; DE FARIA, F.P.; MORTARA, R.A.; FREYMÜLLER, E. & SCHENKMAN, S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. Protist. 158:147-157, 2007.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA. 2010. Encyclopædia Britannica Online. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/4125/acriflavine>>. Acesso em: 31 Mar. 2010.

ESTEVEES M.J.; ANDRADE A.F.; ANGLUSTER J.; DE SOUZA W.; MUNDIM M.H.; ROITMAN I. & PERREIRA M.E. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. Eur. J. Cell Biol. 26:244-248, 1982.

FARIA E SILVA, P.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; SOARES, M.J.; MOTTA, M.C.M.; FIORINI, J.E. & DE SOUZA, W. *Herpetomonas roitmani* (Fiorini *et al.*, 1989) n. comb.: a trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm. J. Protozool. 38: 489- 494, 1991.

FARINA, M.; ATTIAS M.; SOUTO-PADRON T. & DE SOUZA W. Further studies on the organization of the paraxial rod of Trypanosomatids. J Protozool 33: 552–557, 1986.

FIORINI, J.E.; FARIA E SILVA, P.M.; SOARES, M.J. & BRAZIL, R.P. Três novas espécies de tripanosomatídeos de insetos isolados em Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84: 69-74, 1989.

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

FRIDBERG, A.; OLSON, C.L.; NAKAYASU, E.S.; TYLER, K.M.; ALMEIDA, I.C. & ENGMAN, D.M. Sphingolipid synthesis is necessary for the kinetoplast segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. J. Cell Sci. 121: 522-535, 2008.

GADELHA, C.; WICKSTEAD, B.; DE SOUZA, W.; GULL, K. & CUNHA-E-SILVA, N.L. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. Eukaryot. Cell, 4: 516–525, 2005.

GLUENZ, E; SHAW, M. K. & GULL, K. Structural asymmetry and discrete nucleic acid subdomains in the *Trypanosoma brucei* kinetoplast. Mol. Microbiol. 64:1529-39, 2007.

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

GULL K. The cell biology of parasitism in *Trypanosoma brucei*: insights and drug targets from genomic approaches? *Curr. Pharmaceut. Des.* 8: 241-256, 2002.

GUTTMAN H. N. & EISENMAN R. N. Acriflavin-induced loss of kinetoplast deoxyribonucleic acid in *Crithidia fasciculata* (*Culex pipiens* strain). *Nature.* 18: 207:1280-1281, 1965.

HAJDUK, S. L. Demonstration of kinetoplast DNA in dyskinetoplastic strains of *Trypanosoma equiperdum*. *Science* 191: 858–859, 1976.

HAJDUK, S. L. Dyskinetoplasty in two species of trypanosomatids. *J. Cell Sci.* 35: 185-202, 1979.

HAJDUK, S. L. & COSGROVE, W. B. Kinetoplast DNA from normal and dyskinetoplastic strains of *Trypanosoma equiperdum*. *Biochim. Biophys. Acta* 561: 1–9, 1979.

HILL, G. C. Eletron transport system in Kinetoplastida. *Biochim. Biophys. Acta* 456: 149-193, 1976.

HILL, G. C. & ANDERSON, W. A. Effects of acriflavine on the mitochondria and kinetoplast of *Crithidia fasciculata*. *J. Cell. Biol.* 41: 547–61, 1969.

HOARE, C. A. & BENNETT, S. C. J. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. III. Spontaneous occurrence of strains of *Trypanosoma evansi* devoid of the kinetoplast. *Parasitology* 29: 43–56, 1937.

JONATHAN, B. C. Energetics of drug-DNA intercalations. *Biopolymers.* 44: 201-215, 1997.

KEYHANI E.; KHAVARI-NEJAD S.; KEYHANI J. & ATTAR F. Acriflavine-mediated apoptosis and necrosis in yeast *Candida utilis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171: 284-291, 2009.

LANNES-VIEIRA J.; DE ARAÚJO-JORGE T.C.; SOEIRO M.D.E. N.; GADELHA P. & CORRÊA-OLIVEIRA R. 2010. The centennial of the discovery of chagas disease: facing the current challenges. *PLoS Negl Trop Dis.* 4:e645, 2010.

LERMAN, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* 3: 18-30, 1961.

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.* 4: e1000048, 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: 363-369, 2005.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D.L.; VOTÝPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R. & ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot. Cell.* 1: 495-502. 2002.

MACRAE, E. K. & MEETZ, G. D. Electron microscopy of the ammoniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. *J. Cell Biol.* 45: 235-245, 1970.

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

MANAIA A. C. & ROITMAN I. Effect of ethidium bromide on the oxidative metabolism and enzyme profiles of *Crithidia fasciculata*. *J Protozool.* 24: 192-195, 1977.

MEIRELLES, M. N.; JULIANO, M.; CARMONA, L.; SILVA, S. G.; COSTA, E. M.; MURTA, A. C. M. & SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest intracellular development of *Trypanosoma cruzi*. 52: 175-184, 1992.

MICHELS, P. A. M., BRINGAUD, F., HERMAN, M. & HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. Biochem. Biophys. Acta 1763: 1463-1477, 2006.

MONTALVETTI, A.; ROHLOFF, P. & DOCAMPO, R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 279: 3867-3882, 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.

MOTTA, M. C. M. Kinetoplast as a potential chemotherapy target of trypanosomatids. Curr. Pharm. Des. 14:847-854, 2008.

MOTTA M. C.; CATTAPRETA C. M.; SCHENKMAN S.; AZEVEDO-MARTINS A. C.; MIRANDA K.; DESOUZA W. & ELIAS M. C. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. PlosOne. 5:e12415, 2010.

MOTTA, M. C. M.; DE SOUZA, W. & THIRY, M. Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. Microbiology Letters. 221:1 7-23, 2003.

MEIRELLES M. N.; JULIANO L.; CARMONA E.; SILVA S. G.; COSTA E. M.; MURTA A. C. & SCHARFSTEIN J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol Biochem Parasitol. 52:175-184, 1992.

- 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.
- MUNDIM, M.H.; ROITMAN, I.; HERMANS, M.A. & KITAJIMA, E.W. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid tripanosomatid with an endosymbiont. *J. Protozool.* 21: 518-521, 1974.
- NAKAMURA, H., YOKOMURA, E. & HIRAYOSHI, K. Effect of acriflavine on the plasma membrane of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 128: 3067-3070, 1982.
- NASCIMENTO, M. T. C.; GARCIA, M. C. F.; DA SILVA, K. P.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; ATELLA, G. C.; MOTTA, M. C. M & SARAIVA, E. M. Interaction of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* with the *Aedes aegypti* salivary gland. *Acta Tropica* 113: 269–278, 2010.
- NEWTON, B.A. & HORNE R.W. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*: 1. Cytoplasmic structures containing ribonucleoprotein. *Exp. Cell. Res.* 13: 563-574, 1957.
- NITISS, J .L. DNA topoisomerases in cancer chemotherapy: using enzymes to generate selective DNA damage. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1512–1516, 2002.
- NOVEY, F. G.; MCNEAL, W. J. & TORREI, H. N. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *J. Infect. Dis.* 4: 223-276, 1907.
- ODA, L. M.; ALVIANO, C. S.; COSTA E SILVA FILHO, F.; ANGLUSTER, J.; ROITMANI, I. & DE SOUZA, W. Surface anionic group in symbiont-bearing and symbiont-free strains of *Crithidia deanei*. *J. Protozool.* 31: 131-134, 1984.
- OGBADOYI, E. O.; ROBINSON, D. R. & GULL, K. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome

positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol. Biol. Cell* 14: 1769-1779, 2003.

OPPERDOES, F.R. & BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glicosome. *FEBS Lett.* 80: 360-364, 1977.

OPPERDOES, F.R. & MICHELS, A.M. Complex I of trypanosomatidae: does it exist? *Trends in Parasitol.* 24: 310-317, 2008

PALCHADHURI, 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 Biotechnology.* 18: 497-503. 2007.

PAULIN J. J. The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. *J Cell Biol.* 66: 404-413, 1975

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

PODLIPAEV, S. A. & ROKITSKAYA, T. A. Classification of isolate of insects trypanosomatids: isoenzymes analysis. *Parasitology (ST Petersburg).* 33:350-357, 1999.

PORTMAN N. & GULL K. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int J Parasitol.* 40: 135-148, 2010.

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

PREVIATO J. O.; SOLA-PENNA M.; AGOLLOS A. O.; JONES C.; OELTMAN T.; TRAVASSOS L. R. & MENDONÇA-PREVIATO L. Biosynthesis of O-N-acetylglu-cosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*: characterization of a novel uridine diphospho-N-acetylglu-cosamine: polypeptide N-acetylglucosaminyl transferase catalysing formation of the α -N-acetylglucosamine (1-O)-threonine linkage. *J. Biol. Chem.* 273:14982-14988, 1998.

RIOU, G.F.; BELNAT, P. & BENARD, J. Complete Loss of Kinetoplast DNA Sequences Induced by Ethidium Bromide or by Acriflavine in *Trypanosoma equiperdum*. J. Biol. Chem. 225: 5141-5144, 1980.

RIOU, G. & BENARD, J. Berenil induces the complete loss of kinetoplast DNA sequences in *Trypanosoma equiperdum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 350–354, 1980.

ROCHA G. M.; TEIXEIRA D. E.; MIRANDA K.; WEISSMÜLLER G.; BISCH P. M. & DE SOUZA W. Structural changes of the paraflagellar rod during flagellar beating in *Trypanosoma cruzi*. Plos One. 5:e11407, 2010.

RODRIGUES J. C. & DE SOUZA W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. Curr. Pharm. Des. 14:925-938, 2008.

SCHNAUFER A.; DOMINGO G. J. & STUART K. Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. Int J Parasitol. 32: 1071-1084, 2002.

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

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, 2004.

SEN, N. & MAJUMDER, H. K. Mitochondrion of Protozoan Parasite Emerges as Potent Therapeutic Target: Exciting Drugs are on the Horizon. Curr. Pharm. Design 14: 839-846, 2008

SHAPIRO, T.A. Inhibition of topoisomerases in African trypanosomes. *Acta Trop.* 54: 251–260, 1993.

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. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 117-143, 1995.

SHAPIRO, T.A.; KLEIN, V.A. & ENGLUND, P. T. Drug-promoted Cleavage of Kinetoplast DNA Minicircles. *J. Biol. Chem.* 264: 4173-4178, 1989.

SIGMA-ALDRICH. 2010. Disponível em: <
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=A8126|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC>. Acesso em: 14 Mar. 2010.

SILVA C. F.; MEUSER M. B.; DE SOUZA E. M.; MEIRELLES M. N.; STEPHENS C. E.; SOM P.; BOYKIN D. W. & SOEIRO M. N. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3803-3809, 2007.

SILVA-TAHAT, M. R. A.; UEMURA, H. & YANAGI, T. Pararosaniline-induced akinetoplastic *Trypanosoma evansi* formation and characterization. *J. Protozool. Res.* 5: 10–22, 1995.

SIMPSON A. G. B.; STEVENS, J. R. & LUKES J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22:168-174, 2006.

SIMPSON, L. Effect of acriflavine on the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. *J. Cell Biol.* 37: 660-682, 1968.

SOUTO-PADRÓN, T & DE SOUZA, W. Ultrastructural localization of basic proteins in *Trypanosoma cruzi*. *The J. of Histochem. And Cytochem.* 26: 349-358, 1978.

SOUTO-PADRÓN, T. & DE SOUZA, W. Cytochemical analysis at the fine-structural level of trypanosomatids stained with phosphotungstic acid. *J. Protozool.* 26: 551-557, 1979.

STEINERT, M & VAN ASSEL, S. Effets de l'acriflavine sur le kinétoplaste. *Société Belge de Biochimie.* 75: 184-185, 1967.

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.

STUART, K. D. Evidence for the retention of kinetoplast DNA in an acriflavine-induced diskinetoplastic strain of *Trypanosoma brucei* which replicates the altered central element of the kinetoplast. *J. Cell Biol.* 49: 189-195, 1971.

STUART, K. & GELVIN, S. R. Kinetoplast DNA of normal and mutant *Trypanosoma brucei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 1075-1081, 1980.

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.

TOBIE, E. J. Loss of the kinetoplast in a strain of *Trypanosoma equiperdum*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 70: 251-254, 1951.

TRAGER, W. & RUDZINSKA, M. A. The riboflavin requirement and the effects of acriflavin on the fine structure of the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. *J. Protozool.* 11: 133-145, 1964.

TUBBS R. K.; DITMARS W. E. Jr. & VANWINKLE Q. Heterogeneity of the interaction of DNA with acriflavine. *J. Mol. Biol.* 9: 545-557, 1964

URBINA, J. A; MORENO, B.; VIEERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B. N.; YAN, W.; SCOTT, D. A.; MORENO, S. N. J. &

DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. J Biol Chem. 274: 33609-33615, 1999.

VANNIER-SANTOS M. A.; DE CASTRO S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. Curr Drug Targets. 10:246-260, 2009.

VENTURA, R. M.; TAKATA, C. S.; SILVA, R. A.; NUNES, V. L.; TAKEDA, G. F. & TEIXEIRA, M. M. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. J. Parasitol. 86: 1289–1298, 2000.

VICKERMAN K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. Br. Med. Bull. 41:105-114, 1985.

VIEIRA M.; CARVALHO T. U.; CUNHA N. L. & DESOUZA W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 203: 967-971, 1994

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol. 18:124-193, 1966.

WANG, Z. & ENGLUND, P. T. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. EMBO J. 20: 4674–4683, 2001.

WARREN, L. G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*, Chagas, I.: Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasitol. 46: 529-539, 1960.

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. 2010. Disponível em <<http://www.who.int>> 2010. Acesso em 12 Abril. 2010

XU, C. W.; HINES, J. C.; ENGEL, M. L.; RUSSEL, D. G. & RAY, D. S. Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the tripanosomatid *Crithidia fasciculata*. Mol. Cell. Biol. 16: 564-576, 1996.

XU, C. & RAY, D.S. Isolation of proteins associated with kinetoplast DNA networks in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 1786-1789, 1993.

ZUMA. A. A. Estudo do Efeito de Inibidores de Topoisomerasas e ligantes de DNA na proliferação e ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas –Biofísica). 2010.

ZWEYGARTH, E.; KAMINSKY ,R. & WEBSTER, P. *Trypanosoma brucei evansi*: dyskinetoplasia and loss of infectivity after long-term in vitro cultivation. Acta Trop. 48: 95–99, 1990.

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](#)