

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA



JANAINA FERNANDA GONÇALVES NETO

*AValiação "IN VITRO" E "IN VIVO" DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DOS DERIVADOS DA N-AMINOMETILFTALIMIDA
SOBRE **TRYPANOSOMA CRUZI***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
*Janaina Fernanda
Gonçalves Neto*
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A large, stylized handwritten signature, likely of the advisor, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque.

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para
obtenção do Título de Mestre
em Parasitologia.

Orientador: Prof.Dr. Sérgio de Albuquerque

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP G586a
V	
TOMBO BC	48947
PROCC	16-837102
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/00
Nº CPD	

CM00167274-4

BIB ID 239959

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

G586a **Gonçalves Neto, Janaina Fernanda**
 Avaliação "in vitro" e "in vivo" da atividade biológica dos derivados
 da n-aminometilftalimida sobre **Trypanosoma cruzi** / Janaina Fernanda
 Gonçalves Neto. --
 Campinas, SP: [s.n.], 2001

Orientador: Sérgio de Albuquerque
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Cultura. 3. Histologia. 4. Óxido nítrico.
 I. Albuquerque, Sérgio de. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 30 de janeiro de 2002.

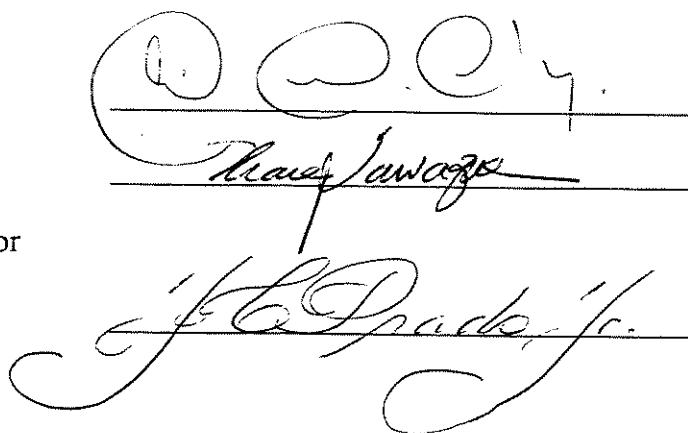
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Prof. Dra. Urara Kawazoe

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

(USP – Ribeirão Preto)

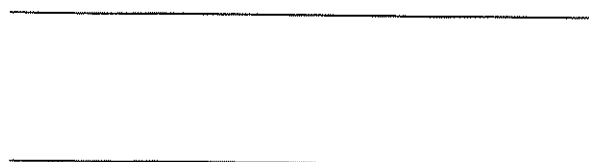


The block contains three handwritten signatures, each on a horizontal line. The first signature is 'S. de Albuquerque', the second is 'Urara Kawazoe', and the third is 'J. Clóvis do Prado Jr.'.

Prof. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

(UNESP – Araraquara)



Two horizontal lines for signatures, corresponding to Prof. Dra. Marlene Tiduko Ueta and Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

Ao Rogélio

A amizade, a compreensão e o incentivo, dados durante todos os momentos, foram a maior prova de amor.

Te amo demais!

Aos meus familiares

O apoio e o carinho de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, meu orientador e amigo, pelo apoio, pela amizade e pela paciência. Aprendi muito com você.

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior e a Prof. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, docentes da disciplina de Parasitologia, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio, pela amizade e incentivo.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio, pela amizade e acolhida, que possibilitou uma convivência agradável e prazerosa.

Aos técnicos da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Toninha, Georgius e principalmente à Míriam pela amizade, pela manutenção dos animais de laboratório, pelo auxílio dado durante à realização dos experimentos.

Aos Colegas do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, principalmente à Ângela Justus e Fabiana Martins de Paula, pela amizade, pela preocupação, incentivo e acolhida.

Aos Colegas do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP que, sem exceção, tornaram os dias que passamos juntos muito mais agradáveis e produtivos. Agradeço pela amizade, apoio e incentivo.

Às Secretárias do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Margareth e Andreia pela amizade e colaboração.

Aos animais de laboratório, meu agradecimento pelo sacrifício necessário para a realização desta pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

A Deus, que sempre está comigo, iluminando o meu caminho, ajudando-me nos momentos mais difíceis.

.....

4.4.2.Ensaio Biológico “in vitro”	34
5.CAPÍTULO II – Atividade Tripanocida “in vivo” dos derivados da N-aminometilftalimida em <i>Mus musculus</i> infectados com duas cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
5.1.Resumo	47
5.2.Introdução	47
5.3.Material e Métodos	49
5.3.1.Síntese das Substâncias testadas	49
5.3.2.Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas	50
5.3.3.Ensaio Biológico “in vivo”	51
5.3.3.1.Grupo de animais	51
5.3.4.Estudo Histopatológico	52
5.3.4.1.Parasitismo	53
5.3.4.2.Análise Morfométrica	54
5.3.5.Análise Estatística	54
5.4.Resultados e discussão	55
5.4.1.Síntese das Substâncias testadas	55
5.4.2.Ensaio Biológico “in vivo”	55
5.4.3.Estudo Histopatológico	66
5.4.3.1.Cepa Y	68
5.4.3.2.Cepa Bolívia	76

5.4.3.3. Análise Toxicológica dos derivados da	
N-aminometilftalimida	84
5.4.4. Análise Morfométrica	97
5.4.4.1. Comparação entre os Subgrupos controle	
sem infecção e infectados	97
5.4.4.2. Comparação entre os Subgrupos infectados	
não tratados e infectados tratados	101
5.4.4.3. Comparação entre os subgrupos sem infecção	
e tratamento paralelo	106
 6. CAPÍTULO III – Indução dos derivados da N-aminometilftalimida	
na produção de Óxido Nítrico (NO)	110
6.1. Resumo	110
6.2. Introdução	111
6.3. Material e métodos	114
6.3.1. Substâncias Analisadas	114
6.3.2. Técnica do Óxido Nítrico	114
6.4. Resultados e discussão	116
 7. CONCLUSÕES GERAIS	119
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. RESUMO

Diante da problemática no tratamento da doença de Chagas, a busca por novas substâncias capazes de combater *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, vem despertando o interesse de vários pesquisadores. Entre os inúmeros compostos testados, os derivados da ftalimida têm apresentado bons resultados no combate ao parasito, conforme a literatura. No presente trabalho, foi avaliada a atividade tripanocida de sete derivados da N-aminometilftalimida sobre duas cepas de *T. cruzi*, com características distintas, através de ensaios “in vitro” e “in vivo”. Além disso, foi verificada a influencia destes compostos na produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos. O ensaio “in vitro”, foi realizado em duas etapas: uma utilizando as formas tripomastigotas e a outra, as formas epimastigotas. No ensaio utilizando as formas tripomastigotas, a substância N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3) apresentou melhor atividade sobre a cepa Y e a substância N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4) sobre a cepa Bolívia. Em relação às formas epimastigotas, a substância N-(fenil)aminometilftalimida (1); N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3); N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4) e N-(4-benzenosulfonilguanidil)aminometilftalimida (5) foram mais ativas sobre a cepa Y enquanto as substância N-(fenil)aminometilftalimida (1); N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3); N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4); N-(4-benzenosulfonilguanidil)aminometilftalimida (5); N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil)amino]aminometilftalimida (6) e N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino]aminometilftalimida (7) sobre a cepa Bolívia. No ensaio “in vivo”

observou-se a parasitemia, o parasitismo tecidual, e a morfometria dos núcleos celulares dos diferentes órgãos. A substância N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino]aminometilftalimida (7) apresentou maior atividade sobre a cepa Y e as substâncias N-(fenil)aminometilftalimida (1); N-(4-metilfenil)aminometilftalimida e N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3) sobre a cepa Bolívia. Sabendo da importância da produção do NO no controle da infecção determinada por *T.cruzi*, os derivados da N-aminometilftalimida foram adicionados em cultura de macrófagos e após 24 horas, observou-se uma indução significativa na produção de NO superior àquela determinada por IFN- γ e o LPS.

2. ABSTRACT

The search for new compounds capable to kill *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, been an interesting subject for researches. According to the literature, phthalimide compounds have showed good results against this parasite.

The present study was carried out to estimate tripanocidal activity of seven N-aminomethylphthalimide compounds in two *T. cruzi* strains, with distinct characteristics, by "in vitro" and "in vivo" assays. The influence of these compounds for nitric oxide (NO) production by macrophages was also analyzed.

The "in vitro" assay, were performed in two parasites stages: trypomastigotes and epimastigotes stages. This assay demonstrated better activity of the N-(4-methoxyphenyl)aminomethylphthalimide (3) against trypomastigote stages of "Y" strain, in contrast to the N-(4-nitrophenyl)aminomethylphthalimide (4) which promoted a better activity against *T. cruzi* Bolivia strain. However, N-(phenyl)aminomethylphthalimide (1); N-(4-methoxyphenyl)aminomethylphthalimide (3); N-(4-nitrophenyl)aminomethylphthalimide (4) and N-(4-benzenesulfonylguanidyl)aminomethylphthalimide (5) showed greater activities against epimastigotes of "Y" strain. In contrast, N-(phenyl)aminomethylphthalimide (1); N-(4-methoxyphenyl)aminomethylphthalimide (3); N-(4-nitrophenyl)aminomethylphthalimide (4) and N-(4-benzenesulfonyl guanidyl)aminomethylphthalimide (5); N-[4-benzenesulfonyl-(2-tiazolyl)amino]amino methylphthalimide (6) and N-[4-benzenesulfonyl-(2-pirimidyl)amino]aminomethyl phthalimide (7), showed greater activities against Bolivia strain.

The “in vivo” assays used as criteria parasitaemia, tissue parasitism and nucleus morphometric analyses of different tissues. Overall the compound N-[4-benzenosulfonyl-(2-pirimidyl) amino]aminometylphthalimide (7) showed better activity against the “Y” strain whereas N-(fenyl)aminometylphthalimide (1); N-(4-metilfenyl)aminometylphthalimide (2) and N-(4-metoxifenyl)aminometylphthalimide (3) revealed a better activity against the “Bolivia” strain.

The importance of Nitric Oxide (NO) production in controlling the acute infection of *T. cruzi* is well known. The influence of different compounds were analized by adding them in cytokine stimulated macrophage cultures and incubated for 24 hours. N-aminometylphthalimide compounds showed a significant induction of NO production when comparing with those stimulated by INF γ and LPS.

3. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma das patologias de mais larga distribuição no Continente Americano. É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos EUA à Argentina. Estima-se que sejam de 16 a 18 milhões os indivíduos infectados e aproximadamente 80 milhões correm o risco da contaminação na América Latina (SCHMUNIS, 1997; WHO, 1991). Apesar de ser considerada uma doença de ocorrência quase que exclusiva na América Latina, entretanto, foi observado aumento na incidência de pacientes soropositivos para *Trypanosoma cruzi* nos Estados Unidos, estando essa situação relacionada com o aumento da imigração latino-americana naquele país (THEIS et al., 1987).

A doença de Chagas é um exemplo típico resultante das alterações produzidas pelo homem ao meio ambiente, das distorções econômicas e injunções sociais. O protozoário responsável pela parasitose, *T. cruzi*, relacionava-se estritamente com a situação silvestre, circulando entre mamíferos no ambiente natural, através da transmissão pelo inseto vetor ou, também, por via oral (ingestão de vetores e mamíferos infectados). O homem ao invadir esses ecótopos, se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo ao hemíptero vetor, vivendas rurais de péssima qualidade, caracterizando assim uma nova forma de colonização do inseto (DIAS & COURA, 1997; VINHAES & DIAS, 2000).

Os triatomíneos, hematófagos restritos, encontraram nas habitações uma condição ideal de abrigo e oferta alimentar, estabelecendo a transmissão vetorial. Tal fato

abriu portas para novos mecanismos se estabelecerem, tais como as transmissões transfusionais e transplacentárias (VINHAES & DIAS, 2000). Entretanto, grandes avanços foram recentemente obtidos no controle da transmissão vetorial e transfusional desta doença, particularmente iniciado pelos Países do Cone-Sul envolvendo Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (URBINA, 1999). Sabe-se que as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas são determinadas entre outros fatores, pela grande diversidade de cepas de *T. cruzi*, cada uma delas apresentam tripomastigotas sanguíneas com características morfológicas distintas. Da mesma forma, diferentes tropismos teciduais, de modo que algumas cepas apresentam na fase inicial da infecção, a tendência em parasitar macrófagos, com nítido reticulotropismo, cepas macrofagotrópicas, outras, tem apresentado nítido miotropismo e miocardiotropismo (BRENER, 1969).

MELO & BRENER (1978) caracterizam as cepas largas por apresentarem tropismo para células musculares, através de receptores específicos na membrana celular e o que as tornam mais adaptadas ao desenvolvimento no inseto vetor. No entanto as formas delgadas estariam mais adaptadas a cumprirem o ciclo tecidual, desaparecendo rapidamente da corrente sanguínea.

A parasitemia sanguínea é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, necessárias para o estabelecimento da correlação anátomo-patológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993). Sendo assim, o estudo da fase aguda da infecção, induzida por *T. cruzi*, pode ser de grande importância, considerando que diferentes autores sugerem que muitas das lesões tardias são influenciadas pelo curso da doença

durante esta fase. Por outro lado, o estudo do comportamento de várias cepas de *T. cruzi* em diferentes hospedeiros experimentais parece indicar que a cepa do parasita influencia nas características da infecção aguda (CASTRO & BRENER, 1985).

Cerca de 20 a 30% das pessoas infectadas progridem para a forma sintomática da fase crônica com envolvimento cardíaco e ou digestivo. A miocardite é a manifestação clínica mais comum da fase crônica, com altos índices de mortalidade (FILARDI & BRENER, 1987). O envolvimento digestivo está associado a áreas epidemiológicas, pois o megacolon e o megaesôfago não foram encontrados em pacientes na fase crônica da doença na Colômbia, na Venezuela, na América Central e no México (CAMARGOS et al., 2000).

As tentativas de se correlacionar o polimorfismo de *T. cruzi* com o seu comportamento biológico tem tido poucos resultados práticos. Essas dificuldades aumentam ainda mais quando se associa os dados morfológicos das amostras com as ações patogênicas e os respectivos quadros clínicos, tanto no homem como em animais experimentais (RIBEIRO et al., 1982).

Diferentes cepas de *T. cruzi* variam extremamente em sua preferência pelo hospedeiro, distribuição geográfica, virulência e tropismo tissular (LIMA et al., 1999). Além disso, diferentes populações podem alterar seu comportamento com a evolução da infecção (DIEGO et al., 1991), incluindo o tropismo tecidual, que foi considerado como fator determinante na patogenicidade (ANDRADE et al., 1999).

Parecer existir uma correlação entre as diferentes formas morfológicas das cepas de *T. cruzi*, com processo da resposta imune por parte do hospedeiro, influenciando não apenas na magnitude de parasitemia, determinando consequentemente a capacidade de

sobrevivência do hospedeiro à infecção (NOGUEIRA et al., 1981), bem como elicitando mecanismos de evasão, como capacidade a penetrar nos tecidos, e permanência na corrente sangüínea frente às diferentes respostas imunoesspecíficas (BRENER, 1969).

De acordo com BRENER & CHIARI (1963) e ANDRADE et al. (1970), as amostras com predomínio de formas finas, devem apresentar período pré-patente e curvas parasitêmicas de ascensão e queda rápida. Já as amostras constituídas por formas largas, mostram um período pré-patente mais demorado e curva parasitêmica de ascensão, e descenso lentos e progressivos. Segundo vários autores, (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1969; RIBEIRO et al., 1982), relataram que as tripomastigotas são inoculadas endovenosamente em camundongos saudáveis, as formas finas desaparecem rapidamente da circulação para cumprirem o seu ciclo celular, ao passo que as formas largas continuam circulando por alguns dias sem serem tomadas por células do hospedeiro.

RIBEIRO et al. (1982), utilizando técnica de centrifugação diferencial de culturas, separaram de uma cepa de *T. cruzi* com características polimórficas, duas subamostras: uma obtida do sobrenadante, constituída de tripomastigotas delgados e a outra, obtida do sedimento, caracterizada pela presença de formas largas do protozoário. Estas subamostras têm sido mantidas regularmente através de subinoculações de sangue em camundongos jovens, passagens em cultura e em triatomíneos, sem modificações em suas características (BELDA NETO & RIBEIRO, 1988 e 1989).

A variabilidade intraespecífica de *T. cruzi* pode ser facilmente verificada por meio da sua morfologia, mas muitos autores relatam que as diferenças genéticas do parasita podem contribuir para sua diversidade. Portanto, as diferenças genotípicas podem estar

relacionadas com o comportamento da cepa durante a infecção de camundongos, principalmente na parasitemia, tropismo tecidual, virulência e mortalidade (MATTEI et al., 1977; SOUZA, 1989).

BARRET et al. 1980 classificou através de análise de DNA, as populações de *T. cruzi*, onde relacionaram o tipo de zimodema encontrado com os ciclos biológicos. Assim cepas que apresentam zimodema II estariam associadas ao ciclo doméstico e cepas portadoras de zimodemas I e III relacionam-se com o ciclo silvestre.

Mais recentemente, marcadores moleculares separaram os distintos grupos em duas linhagens filogeneticamente diferentes, associadas com a transmissão pelo ciclo domiciliar (linhagem I) e pelo ciclo silvestre (linhagem II) (SOUTO et al., 1996; ZINGALES et al., 1998 e 2000; FERNANDES et al., 1998; JANSEN et al., 1999).

Baseados nas evidências da presença de imunoglobulinas na membrana dos tripomastigotas, detectadas por método de imunofluorescência e de lise pelo complemento e, considerando que esta lise pode ser uma consequência da presença de anticorpos em sua membrana, RIBEIRO et al. (1988a), verificaram o aspecto paradoxal da ausência de lise dos tripomastigotas da cepa Bolívia, já que estes também possuem anticorpos em sua superfície. Da mesma forma, estudos de reações de aglutinação em tripomastigotas sanguíneas das cepas Y e Bolívia, observou-se que em presença de soros específicos as formas finas se aglutinam, enquanto que as largas não (SIQUEIRA et al., 1973). Por outro lado RIBEIRO et al. (1986), comprovou os dados relatados a cima, ao realizar reações de aglutinação com as subamostras finas e largas da cepa Bolívia de *T. cruzi*. A sub-população constituída por formas finas aglutinaram em comparação a sub-população das formas

largas.

Diante dessa diversidade de cepas do parasita, EBERT & HERRE (1996), relataram a hipótese que o tipo de cepa pode elicitar maior ou menor resposta celular ou humoral, criando condições para a manutenção da virulência e o controle da infecção. Cepas altamente virulentas podem destruir seus hospedeiros e as menos patogênicas, contribuem para a transmissão do parasita antes que estes sejam destruídos pelo sistema imunológico do hospedeiro.

A análise histológica dos diferentes tecidos obtidos de hospedeiros com infecção crônica por *T. cruzi*, geralmente apresentam processo inflamatório e fibrose, sendo o encontro de parasitas escasso ou a presença de pequenos ninhos de amastigotas. Esta observação tem sido utilizada como um dos possíveis causas da autoimunidade dos processos autoimunes, causadores em potencial dos danos teciduais que ocorrem na fase crônica da doença de Chagas. Porém, a utilização de técnicas histológicas sensíveis, permite a evidenciação de células parasitadas em diferentes órgãos como coração, músculo esquelético e outros tecidos, dependendo do tropismo do parasito (TARLETON & ZHANG, 1999).

Inúmeros autores relataram a presença de infiltrado inflamatório e lesões teciduais no coração chagásico tanto na infecção humana como em animais de laboratório. Entre as células presentes no infiltrado inflamatório, eosinófilos e neutrófilos parecem ser os mais recrutados para a destruição dos parasitas presentes nos tecidos (KIERSZENBAUM, 1996).

Entretanto, o controle da carga parasitária e da sobrevivência do hospedeiro

parece depender da resposta celular imune, através da ativação dos macrófagos, com produção de inúmeras citocinas de fase aguda. O IFN- γ (Interferon) é a citocina mais importante envolvida na resposta imune anti-*T. cruzi*. Além disso, os macrófagos também podem ser ativados “in vitro” pelo LPS (Lipolysacharide), componente encontrado na parede da célula de bactérias gram-negativas (GOLDEN & TARLETON, 1991).

ABRAHAMSOHN & COFFMAN (1996), relataram que adição do IFN- γ e TNF- α (Tumor Necrosis Factor) em culturas de macrófagos infectadas com *T. cruzi* resultam na destruição das formas amastigotas pela fagocitose, e que a adição de TGF- β (Transforming Growth Factor) ou IL-10 (Interleukin) inibem a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ . Apesar da importância da ativação dos macrófagos pelas citocinas durante a infecção chagásica, isto não determina a destruição total dos parasitas (GOLDEN & TARLETON, 1991).

Sendo assim, as diferenças morfológicas, grau de patogenicidade e distinto tropismo celular das diferentes cepas de *T. cruzi*, podem induzir respostas imunológicas variadas, que irão influenciar na suscetibilidade das cepas frente às mais diversas compostos testados sobre *T. cruzi*. Algumas drogas podem apresentar uma determinada ação sobre uma população e não se manifestar ativamente sobre outras, bem como, podem agir indistintamente, de acordo com o mecanismo de ação por elas desencadeados.

3.1. Evolução do Tratamento da doença de Chagas e situação atual

O interesse pela pesquisa de substâncias com atividade biológica sobre o *T. cruzi*, na doença de Chagas experimental, vem sendo motivo de grande perspectiva entre os pesquisadores que atuam nessa área. Sendo assim, várias substâncias já foram testadas “in vitro” e “in vivo”, motivo pelo qual tem aumentado interesse nas pesquisas de novas substâncias por Instituições e Indústrias Farmacêuticas, na tentativa de encontrar um princípio ativo realmente eficaz contra este parasito, porém sem graves efeitos colaterais.

Atualmente encontra-se disponível uma grande variedade de trabalhos, que relatam a utilização de diferentes substâncias na tentativa de estabelecer-se uma terapia nas distintas fases evolutivas da doença (BRENER, 1984).

Dentre as substâncias testadas no combate ao parasitismo, destacam-se os derivados das bisquinaldinas, que demonstraram atividade contra *T. cruzi* e, foram durante alguns anos, os medicamentos recomendados no tratamento da doença (IENSCH, 1937).

Alguns antibióticos, como a acromicina e a anfotericina B, bem como alguns derivados das 8-aminoquinoleínas, foram também avaliados por CHRISTEN et al. (1951).

BRENER (1966) estudou o modo de ação de dois compostos nitrofurânicos (NF-902 e Furadantin sódico) e um composto fenantridínico em cultura de células de embrião de galinha infectadas com *T. cruzi*, observando que os compostos nitrofurânicos apresentaram uma ação eficaz contra as formas intracelulares do parasito, em contraposição com fenantridínico que não apresentou atividade.

A nitrofurazona (5-nito-furaldeído-semicarbazona) foi testada sobre as formas intracelulares de *T. cruzi* através do estudo histopatológico, verificando-se que as formas

amastigotas foram destruídas dentro do citoplasma das células parasitadas, sendo que algumas células infectadas também foram destruídas, enquanto que as células vizinhas não parasitadas, conservaram-se íntegras (ANDRADE & BRENER, 1969).

THOMPSON et al. (1969) verificaram que a substância PAM 1392 [2,4-diamino-6-(3,4-diclorobenzilamino) quinazolina] mostrou-se ativa em meio de cultura, sobre as formas intra e extracelulares de *T. cruzi*. Quanto ao ensaio “in vivo”, não foi observada a cura parasitológica.

A ação do 1,2,3,4-tetra-hidro-5H-pirido [4,3-b]indol e do 1,2,3,4-tetra-hidro-9H-pirido[3,4-b]indol sobre *T. cruzi*, demonstraram atividade contra as formas tripomastigotas sanguíneas (GARMAISE, 1972).

ANDRADE & MACEDO (1973) trataram alguns camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*, com nitrofurânico Bayer 2502 e com o corticóide betametasona simultaneamente. Estes autores, observaram maior sobrevida dos animais, parasitemia negativa e diminuição das lesões inflamatórias, quando comparados aos grupos controles, tratados com a substância Bayer 2502 ou apenas com o corticóide.

Os efeitos do benzonidazol sobre *T. cruzi*, em ensaios realizados “in vivo” e “in vitro” com as formas epimastigotas, foram estudados por POLAK & RICHLE (1978), onde constataram que, após administração dessa substância em camundongos infectados pela cepa Y, houve diminuição da parasitemia e inibição da síntese de proteínas e de RNA do parasita, em meio de cultura.

O derivado 5-nitrofurano (SQ 18506), proporcionou a redução da infectividade e da mobilidade das formas tripomastigotas e epimastigotas, quando tratadas “in vitro” com

esta substância (SIMS & GUTTERIDGE, 1978).

A anfotericina B, um antibiótico efetivo contra as células eucariontes, foi testada “in vitro”, contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, mostrando-se efetiva sem causar lise das células do sangue (CRUZ et al., 1980).

ÁVILA & ÁVILA (1980), observaram diminuição significativa da parasitemia e mortalidade nos camundongos infectados com *T. cruzi*, quando submetidos ao tratamento com o alopurinol. Os mesmos autores testaram essa substância através de ensaio “in vitro” em cinco diferentes cepas do parasita, e obtiveram a mesma atividade tripanocida, como no estudo anterior. Os efeitos “in vivo” do alopurinol sobre camundongos infectados e tratados, revelaram um efeito supressor da parasitemia (ÁVILA & ÁVILA, 1981).

O composto 353C[(E)-1-(4'-bromo-4-bifenil)-1-(4-clorofenil)-3-dimetilamino prop-1-eno], apresentou alta atividade contra *T. cruzi*, sendo de 10 a 20 vezes mais eficaz que o benzonidazol e o nifurtimox (BARRET et al., 1982).

O Megazol (CL 64855) tem uma ampla atividade antibactericida e antiparasitária. FILARDI & BRENER (1982) obtiveram alta porcentagem de cura em infecções pelas cepas de *T. cruzi*, altamente resistentes ao nifurtimox e benzonidazol.

Derivados do 5-nitrimidazol (MK 436), 3-(-1metil-5-nitroimidazol-2-il)-3^a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1.2-benzisoxazol e o L634.549, cis-3a.,4,5,6,7,7a-hexahidro-3-(-1-metil-5-nitro-1H-imidazol-2-il), foram testados em cultura de tecido e em camundongos infectados com um clone derivado da cepa Y de *T. cruzi*. Os compostos MK 436 e L634.549, demonstraram atividades contra as formas amastigotas, sem destruir as células dos hospedeiros nas condições utilizadas. Nos ensaios “in vivo”, apenas o composto MK

436 apresentou cura parasitológica na concentração de 30mg/kg, administrado durante 20 dias (MURRAY et al., 1983).

A atividade do Cetoconazol foi verificada sobre a cepa Y de *T. cruzi*, através de ensaios “in vitro” e “in vivo”. Esta substância promoveu alta proteção aos camundongos infectados, diminuindo os níveis parasitêmicos e a replicação das formas amastigotas (McCABE et al., 1984).

A atividade dos derivados da pirazolopirimidina foi estudada por ÁVILA et al. (1987), onde os autores testaram a capacidade destas substâncias em inibir a multiplicação das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Estes autores, relataram que a substância 7-hidroxi-3- β -D-ribofuranosilpirazol-(4,3-d)piridina apresentou melhor atividade tripanocida, em relação às demais substâncias.

BARIOGLIO et al. (1987), estudaram os efeitos da clomipramina (antidepressivo) sobre a motilidade das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, através de ensaios “in vitro” e “in vivo”. No ensaio com as formas tripomastigotas, observaram a imobilização destas formas, e para a comprovação da atividade, o sangue utilizado neste ensaio foi inoculado em camundongos saudáveis, sendo que alguns dias após, estes camundongos não se apresentaram infectados. Em relação ao ensaio “in vivo”, foi observada a cura destes animais.

RIBEIRO et al. (1988a) verificaram a atuação do nifurtimox e do benzonidazol sobre duas cepas do *T. cruzi*: cepa Y, contendo predominantemente formas delgadas e a cepa Bolívia, com predominância de formas largas. Observaram que, os camundongos

tratados com nifurtimox, apresentaram índice de cura de 35% quando infectados intraperitonealmente pela cepa Y, e ausência de cura em camundongos infectados intraperitonealmente pela cepa Bolívia. Já os camundongos tratados com benzonidazol, apresentaram 57% de cura para a cepa Y e 18% para a cepa Bolívia. Isto demonstra as diferenças na suscetibilidade e resistência das diferentes cepas do parasito ao tratamento da doença de Chagas.

GOAD et al. (1989), estudando as formas epimastigotas em meio de cultura (LIT – CAMARGO, 1964), e as formas tripomastigotas e amastigotas em cultura de células diplóides de pulmão humano, expostas ao tratamento com Ketoconazol, alcançaram os mesmos resultados apresentados por McCABE et al. (1984), onde as formas amastigotas foram mais sensíveis à ação desta substância em relação às demais formas.

A atividade do antidepressivo imipramina e seus derivados, foi testada sobre *T. cruzi*, através de ensaio “in vitro”. O composto 2-nitrodesmetilimipramina apresentou melhor resultado quando comparado com outros derivados (DOYLE & WEINBACH, 1989).

A utilização da Interleucina-2 como agente tripanocida, foi verificada por HULSEBOS (1989), onde os autores observaram a redução dos níveis parasitêmicos e aumento da sobrevivência dos animais infectados e tratados.

Os efeitos dos derivados do ácido 3-fosfonopropiônico sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foi verificado através de ensaios “in vitro” e “in vivo”. Apenas o (R,S)-3-FENIL-3-(O,O-dietilfosfono)-propionato de etila exerceu atividade sobre o parasita, e os demais derivados causaram efeitos tóxicos aos animais (LOPES et al., 1990).

Os derivados do 1-benzil-5-aminoimidazol-4-carboxamida, demonstraram inibir a infecção por *T.cruzi* em camundongos. Os compostos 1-(-4-clorobenzil) e 1-(3,4-diclorobenzil) mostraram-se sete vezes mais ativos que o nifurtimox na supressão dos parasitas em camundongos na fase aguda da infecção (CHABALA et al., 1991).

CRUZ et al. (1991), verificaram que as formas metacíclicas da cepa Y de *T.cruzi*, tratadas com actinomicina D, perderam a capacidade de replicação em meio de cultura, no sangue e nos tecidos de camundongos.

As fenotiazinas (clorpromazina e triflupromazina) quando adicionadas em meio líquido e em cultura de células cardíacas, inibiram as formas amastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*. Porém, estas substâncias apresentaram toxicidade sobre as células cardíacas (CASTRO et al., 1992).

Dentre todas as substâncias estudadas até aqui, o tratamento da doença de Chagas tem sido concentrado em apenas duas substâncias, benzonidazol e nifurtimox (BRENER, 1984; CROFT, 1999). Sendo a quimioterapia para essa doença ainda insatisfatória (ANDRADE et al., 1996).

O nifurtimox, é um medicamento que apresenta um efeito supressivo na fase aguda da infecção (RASSI et al., 1998), enquanto que na fase crônica, não exerce cura parasitológica (CASTRO, 1993; ANDRADE et al., 1996; CROFT, 1999; STOPPANI, 1999; URBINA, 1999). Embora possa apresentar algum benefício ao paciente, os efeitos colaterais promovidos por este composto, podem comprometer o tratamento, já que apresentam propriedades mutagênicas e carcinogênicas em animais experimentais (ENGEL et al., 1998; STOPPANI, 1999).

O benzonidazol apresenta, como o nifurtimox, uma rápida supressão da parasitemia em indivíduos infectados durante a fase aguda da doença de Chagas. A maioria dos pacientes tratados, demonstraram positividade algum tempo após o início do tratamento (CASTRO, 1993; ANDRADE et al., 1996; CROFT, 1999; STOPPANI, 1999; URBINA, 1999) e os efeitos colaterais são tóxicos aos usuários (ENGEL et al., 1998; STOPPANI, 1999).

Em crianças, estas duas drogas produzem efeitos colaterais, geralmente de menor gravidade que incluem anorexia, vômitos, alergias e outros (RASSI & LUQUETTI, 1992; CASTRO, 1993; CROFT, 1999; ENGEL et al., 1998; URBINA, 1999).

O benzonidazol demonstra ser mais eficiente que o nifurtimox na redução da parasitemia. Entretanto, deve-se levar em consideração que a eficácia destes compostos variam de acordo com a área geográfica, bem como as diferenças na suscetibilidade das cepas de *T. cruzi* às substâncias (FILARDI & BRENER, 1987; GIOVANNI-DE-SIMONE et al., 1987; LEVI et al., 1996; STOPPANI, 1999). Isto talvez, possa explicar os resultados contraditórios obtidos após o tratamento específico para a doença de Chagas (ANDRADE et al., 1985a; FILARDI & BRENER, 1987).

O Megazol é extremamente ativo contra as formas intracelulares do parasito no hospedeiro vertebrado e apresenta alto potencial de cura em infecções por cepas resistentes ao tratamento com nifurtimox e benzonidazol (MURRAY et al., 1983; FILARDI & BRENER, 1982; ANDRADE et al., 1989)

Devido aos graves efeitos colaterais produzidos pelo benzonidazol e pelo nifurtimox, diversas drogas estão sendo estudadas em animais experimentais e poucas

foram testadas em seres humanos, algumas por apresentarem efeitos colaterais e potencial de teratogenicidade (CASTRO, 1993).

A Anfotericina B demonstrou-se altamente ativa contra *T. cruzi*, além de espécies do gênero *Leishmania* e Fungos, mas a sua utilização foi limitada, devido aos efeitos colaterais tóxicos proporcionados (CASTRO, 1993).

COURA (1996), relatou que vários compostos estão sendo utilizados durante a fase aguda da doença de Chagas como, os derivados da quinoleína, arsenobenzol sulfurado e outros arsenicais, compostos da fenantridina, diversos anti-maláricos e outros arsenicais antimonialis, sais de ouro, bismuto, cobre e estanho, violeta-de-genciana, aminopterina, ácido paraminosalicílico, hidrazida de ácido nicotínico, anti-histamínicos, sulfamídicos hipoglicemiantes, ACTH e cortisol, anfotericina B e derivados estilomicina, e de actinomicina. Todos esses compostos apresentaram baixa eficácia ou elevada toxicidade durante os experimentos, confirmando ou contradizendo os resultados relatados por outros autores. Observou ainda que o Fenoxinidazol demonstrou-se muito ativo na infecção experimental em ratos tanto para as formas tripomastigotas como amastigotas, dependentes porém da cepa do parasita. Outros nitroimidazólicos como o Metronidazol (Flagil) e derivados azólicos antifúngicos como o Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol demonstraram atividade em ensaios “in vitro” e “in vivo”, mas não apresentaram efeitos curativos na experimentação clínica. Desta mesma forma, o Alopurinol, Gossipol (antifertilizante), e produtos naturais como Própolis, Taxol e diversos alcalóides não demonstraram cura parasitológica.

URBINA et al. (1996) sugerem que o D0870, um derivado bitriazólico, antifúngico, proporciona a cura da infecção, agindo tanto na fase aguda como crônica em ratos. Além disso, esta substância também utilizada para tratamento em pacientes aidéticos.

A alternativa terapêutica na evolução da doença de Chagas em pacientes com miocardite chagásica crônica terminal pode ser realizada pela reabilitação através do transplante cardíaco (BOULLON et al., 1988). Estes pacientes são submetidos à terapia imunossupressiva, para prevenir a rejeição (ANDRADE et al., 1996).

Novos aspectos são discutidos devido a associação da doença de Chagas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). Doença de Chagas em hospedeiros imunocomprometidos não está exclusivamente relacionado a Aids, e sim, com a ação de drogas imunossupressivas que são aplicadas na quimioterapia do tratamento de câncer e transplantes. As drogas imunossupressivas podem modular a resposta imune celular e a produção de anticorpos, afetando o sistema imunológico do indivíduo. No passado, a ciclofosfamida (CY) foi usada na terapia imunossupressiva para transplantes cardíacos. No momento, as drogas mais utilizadas para esta situação são formadas pela ciclosporina A (CsA), azatioprina e o corticóide. O uso experimental de drogas imunossupressivas demonstrou que a ciclofosfamida injetada após a infecção pelo *T.cruzi*, induz o aumento da miocardite (CALABRESE, 1999).

Todas as substâncias recomendadas para o tratamento das tripanosomíases e leishmanioses possuem limitações, incluindo a eficácia, toxicidade, tratamento prolongado, resistência e problemas de suscetibilidades, ou combinações entre estas limitações (BRENER, 1984; CROFT, 1999).

Atualmente, a pesquisa de novas drogas antitripanocidas e antileishmanioses, está relacionada com a identificação e caracterização da bioquímica e alvos moleculares destes parasitas. O objetivo na pesquisa de novas substâncias, incluem aspectos que estimulem as células infectadas a destruir os parasitas (FAIRLMAB, 1990; CROFT, 1999).

De acordo com as observações citadas por vários autores, há evidências de que as diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam suscetibilidades próprias aos efeitos da resposta imune, desenvolvida pelo hospedeiro durante a infecção chagásica. Segundo RIBEIRO et al. (1988a), provavelmente este fato esteja relacionado, ao mecanismo de ação das substâncias, pois foi evidente a diferença de resposta ao tratamento quando os autores testaram com cepas distintas do parasita, aventaram a hipótese da existência de populações de *T. cruzi* resistentes à terapêutica utilizada na doença de Chagas experimental.

Vários tratamentos podem diminuir os sintomas na fase aguda, mas não podem erradicar totalmente o parasita, além de produzirem efeitos colaterais tóxicos (McCARTHY, 1996).

Com isso, pode-se concluir que ainda não existe uma substância realmente eficaz ao tratamento da infecção chagásica, já que aquelas em uso são consideradas tóxicas. A associação ou a escolha de substâncias no controle do quadro clínico apresentado pelo indivíduo chagásico, bem como o tratamento cirúrgico, estão sendo empregados para tentar minimizar os efeitos provocados pela doença de Chagas.

GALLERANO et al. (1990), demonstraram através de seus experimentos, que o alopurinol é tão efetivo quanto os nitrofuranos no tratamento da fase aguda da doença de Chagas.

Segundo estudos realizados pela WHO (1984) a violeta-de-genciana ainda pode ser considerada como a única substância ativa no controle da doença de Chagas transfusional e recomenda estudos sobre eventuais efeitos deletérios deste sal sobre as células sangüíneas.

Sendo assim, este sal vem sendo utilizado até os dias atuais, na quimioprofilaxia da doença de Chagas transfusional. Entretanto, o desconhecimento do mecanismo de ação, o receio de efeitos colaterais e a ação tóxica sobre os elementos figurados do sangue e, principalmente, a cor violeta, tem limitado a sua utilização (SOUZA, 1989).

3.2.Derivados da Ftalimida

A atividade de compostos contendo como grupamento básico a ftalimida, tanto sobre bactérias, quanto sobre parasitas patogênicos, vem despertando o interesse de autores na síntese de derivados que possuam a capacidade de interferir na estrutura ou multiplicação desses agentes, inibindo assim a instalação ou agravamento da infecção provocada.

Estudos realizados por VARMA (1974), utilizando compostos derivados da N-hidroximetilftalimida, inibiram o desenvolvimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Aerobacter aerogenes* em meio de cultura.

Os ésteres derivados da N-hidroximetilftalimida demonstraram atividade sobre o desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti* e principalmente sobre o molusco

Biomphalaria glabrata, onde este derivado causou a morte de 100% destes moluscos em 24 horas após a aplicação (LOPES, 1975). Ainda sobre *Biomphalaria glabrata* (LOPES et al. 1980), os ésteres derivados da N-(2-hidroxietil)-ftalimida, demonstrou-se bastante ativos, mesmo após 24 horas da aplicação inicial.

Com relação a *T.cruzi*, NASI (1989), demonstrou a atividade de vários derivados ativos de N-aquil e N-arilftalimidas sobre as formas em cultivo (epimastigotas) e tripomastigotas sanguíneas, sendo que as substâncias mais ativas demonstraram comportamento diferenciado em relação às cepas com características morfológicas diferentes.

ALBUQUERQUE et al. (1991), observaram atividade “in vitro”, sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* das substâncias N-clorometilftalimida, N-hidroxietilftalimida e N-hidroxiftalimida sobre cepas distintas, verificando que a mortalidade de 100% das formas ocorreu após 48 horas de incubação do material na concentração de 90µg/mL de cada substância.

ALBUQUERQUE (1995), ainda observou que algumas aminas alifáticas e aromáticas derivadas da N-aminometilftalimida, apresentaram atividade significativa sobre a cepa Y de *T. cruzi* em ensaios realizados sobre as formas tripomastigotas, sendo que as mesmas substâncias não demonstraram qualquer tipo de alteração, tanto a nível parasitêmico quanto à nível de cura, quando administradas a camundongos infectados com a mesma cepa do parasita.

Segundo SHIBATA et al. (1996) e MIYACHI et al. (1997), os derivados da ftalimida influenciam na produção de TNF, desempenhando desta forma, um importante papel no controle da infecção, pois esta citocina está relacionada com a ativação dos macrófagos e produção de NO (Nitric Oxide).

4. CAPÍTULO I

Atividade Tripanocida “in vitro” dos derivados da N-aminometilftalimida

4.1. Resumo

A atividade tripanocida dos derivados da N-aminometilftalimida, foi avaliada através de ensaios “in vitro” utilizando sangue de *Mus musculus* infectados com duas diferentes formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotas sangüíneos e epimastigotas mantidas em meio de cultura axênico (LIT). Foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes grupos de linhagens. Os resultados do presente trabalho, demonstraram que as substâncias avaliadas possuem potencial tripanocida, visto que várias delas apresentaram valores de IC₅₀ significativo.

4.2. Introdução

Desde a descoberta por CHAGAS em 1909, a doença de Chagas vem sendo conhecida como uma endemia americana difícil de ser combatida devido a multiplicidade de suas características. Afetando atualmente cerca de 18 milhões de pessoas em toda a América Latina (URBINA, 1999), causando a morte de aproximadamente 400.000 pessoas/ano.

Diante de toda problemática, o interesse pela pesquisa de compostos com atividade biológica sobre *T. cruzi*, vem sendo desenvolvida com o intuito de obterem compostos capazes de atuarem sobre o parasita, porém desprovidos dos graves efeitos colaterais. Atualmente em bancos de sangue, a única substância efetiva e suscetível contra as formas tripomastigotas é a violeta-de-genciana (SOUZA, 1989; MARTINEZ – DIAS et al., 2001; RAMIREZ et al. 1995). No Brasil, a única droga de alta atividade tripanomicida é o benzonidazol conhecido comercialmente como ROCHAGAN (BRENER, 1984; LIMA 1995; CROFT, 1999). Entretanto o tratamento da doença de Chagas é insatisfatório, devido a toxicidade, problemas digestivos e problemas cromossômicos em crianças, provocados pelo benzonidazol (GORLA et al., 1988, ANDRADE et al., 1996; ENGEL et al., 1998, STOPPANI, 1999).

VARMA, 1974 e ALBUQUERQUE et al., 1991 demonstraram que compostos contendo como grupamento básico a ftalimida possuem atividade biológica tanto sobre bactérias, quanto sobre parasitas patogênicos para o homem. Estes resultados culminaram no interesse da síntese de derivados que possuam a capacidade de interferir na estrutura ou multiplicação desses agentes, inibindo a instalação ou agravamento da infecção provocada, sem demonstrarem uma atividade tóxica para o organismo do hospedeiro.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Substâncias testadas

Os derivados da N-aminometilftalimida foram sintetizados através da reação da N-aminoftalimida com amidas aromáticas, com base na técnica descrita por WISTEWAD & HEINE (1955) E NASI (1989), cujas nomenclaturas e estruturas químicas estão demonstradas na Figura 1.

Em capela, foram adicionados em um erlenmeyer, piridina e a N-aminoftalimida. Ao sistema, em constante agitação, foi adicionada lentamente a amida aromática. Após o término da adição, o sistema foi fechado com rolha de borracha, e a agitação foi mantida até não se observar mais a presença de sólido no sistema. Em seguida, foi adicionada água destilada em excesso, com a finalidade de interromper a reação e promover a precipitação da amida. A amida obtida foi filtrada em büchner, lavada com o de água destilada e secada à temperatura ambiente.

A avaliação qualitativa do desenvolvimento da reação entre N-aminoftalimida e amidas aromáticas foi realizada através dos intervalos de fusão e espectro de infravermelho.

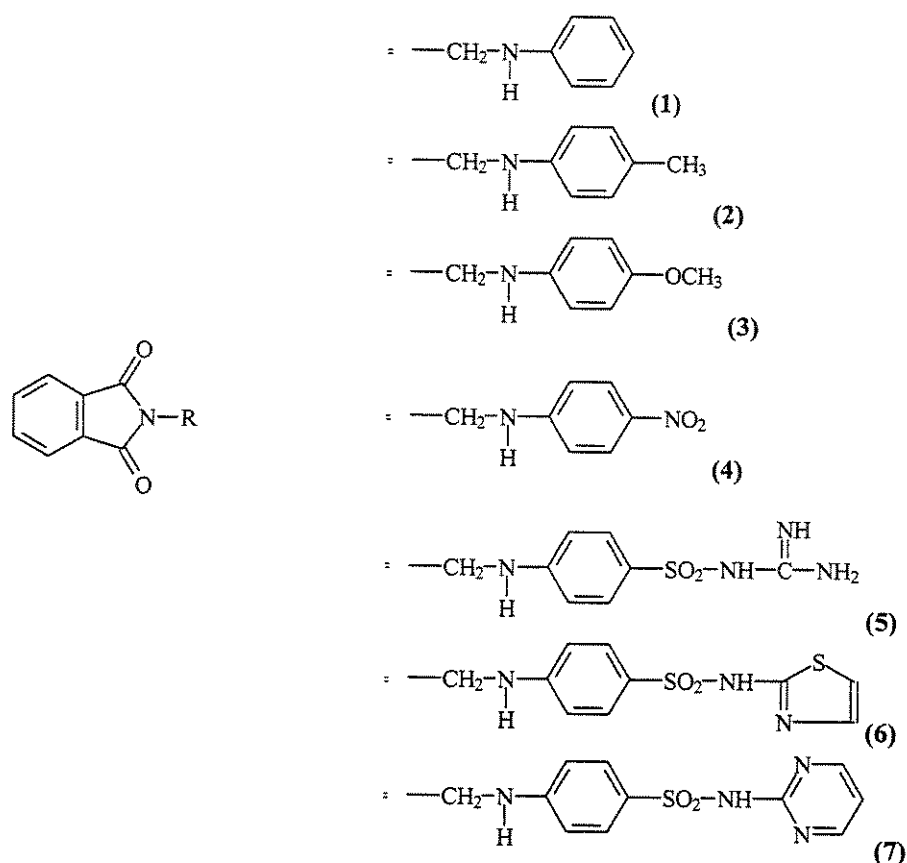


Figura 1. Aspecto estrutural dos derivados da Ftalimida avaliados: (1).N-(fenil)amino metilftalimida; (2).N-(4-metilfenil)aminometilftalimida; (3).N-(4-metoxifenil) aminometilftalimida; (4).N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida; (5).N-(4-benzeno sulfonilguanidil)aminometilftalimida; (6).N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil) amino]aminometilftalimida; (7).N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino] aminometilftalimida.

4.3.2.Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Duas cepas com características morfológicas distintas foram utilizadas:

Cepa Y - (PEREIRA & NUSSENZWEIG, 1953) caracterizada por formas delgadas e tropismo tecidual para células do sistema fagocitário mononuclear. MILES et al. (1980) classificaram essa cepa como *T.cruzi* II, pertencente ao Zimodema II. O Zimodema

II foi caracterizado como cepas que participam do ciclo doméstico, originado de infecções humanas e de animais domiciliados (MILES et al., 1980; ZINGALES, 2000).

Cepa Bolívia - (FUNAYAMA & PRADO JÚNIOR, 1974) apresenta característica morfológica de forma larga e tropismo para células musculares e glandulares. De acordo com suas características, esta cepa foi classificada como *T.cruzi* I, equivalente ao Zimodema I (MILES et al., 1980). O zimodema I corresponde às cepas que pertencem ao ciclo silvestre, sendo originada de animais e espécies de triatomíneos selvagens (MILES et al.1980; ZINGALES, 2000).

4.3.3.Ensaio Biológicos “in vitro”

4.3.3.1.Formas tripomastigotas

Os ensaios foram realizados utilizando-se sangue de *Mus musculus* machos, pesando 20-23g, infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas sanguíneas de ambas as cepas. O sangue foi obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico de cada cepa, 7º dia para a cepa Y e 14º dia para a cepa Bolívia. Foram utilizadas aproximadamente 10^6 formas tripomastigotas do parasito/mL. Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação (96 poços), em triplicata, usando as substâncias nas respectivas concentrações: 10, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL. O material foi incubado de acordo com os parâmetros utilizados em Bancos de Sangue, a 4°C por 24 horas, sob agitação constante. Após este período, foi quantificada a atividade dos compostos através da contagem das

formas tripomastigotas, de acordo com o método descrito por BRENER (1962). Os compostos que apresentaram lise parasitária de 100%, foram inoculados em 3 camundongos albinos, machos, pesando 20-23g. Para comprovação da eficácia dos compostos, verificou-se a parasitemia destes animais a partir do 5º. dia após o inóculo.

Como controle de atividade, foi utilizada a violeta-de-genciana nas mesmas concentrações acima relatadas, e como controle negativo, foi utilizado DMSO (Dimethyl Sulfoxide), na mesma concentração utilizada para a solubilização das amostras.

4.3.3.2. Formas epimastigotas

As formas epimastigotas foram obtidas através do meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro bovino fetal (CAMARGO, 1964). Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que após adição dos compostos, foi efetuada a curva de crescimento exponencial dos parasitas. Atividade biológica foi avaliada pela técnica similar descrita acima, usando as mesmas concentrações para cada substância e as formas epimastigotas do parasita foram contadas pelo método de BRENER (1962) a cada dois dias, por um período de 15 dias. Benzonidazol foi utilizado como controle positivo.

4.4.Resultados e discussão

4.4.1.Substâncias utilizadas

Os resultados obtidos após a síntese das substâncias, referentes às características físicas dos compostos sintetizados (intervalo de fusão e espectro de infravermelho) estão representados na Tabela 1 e Figuras 2 a 8, respectivamente.

Tabela 1. Determinação dos intervalos de fusão dos derivados da N-aminometilftalimida.

Substância	Intervalo de Fusão (°C)
(1)	146 - 148
(2)	174 – 175
(3)	144 – 145
(4)	234 – 235
(5)	212 – 214
(6)	220 – 222
(7)	238 – 241

Por meio dos dados obtidos, e visualizados na Tabela 1, conclui-se que as sínteses dessas substâncias ocorreram com sucesso, quando comparadas com os dados demonstrados na literatura (NASI, 1989).

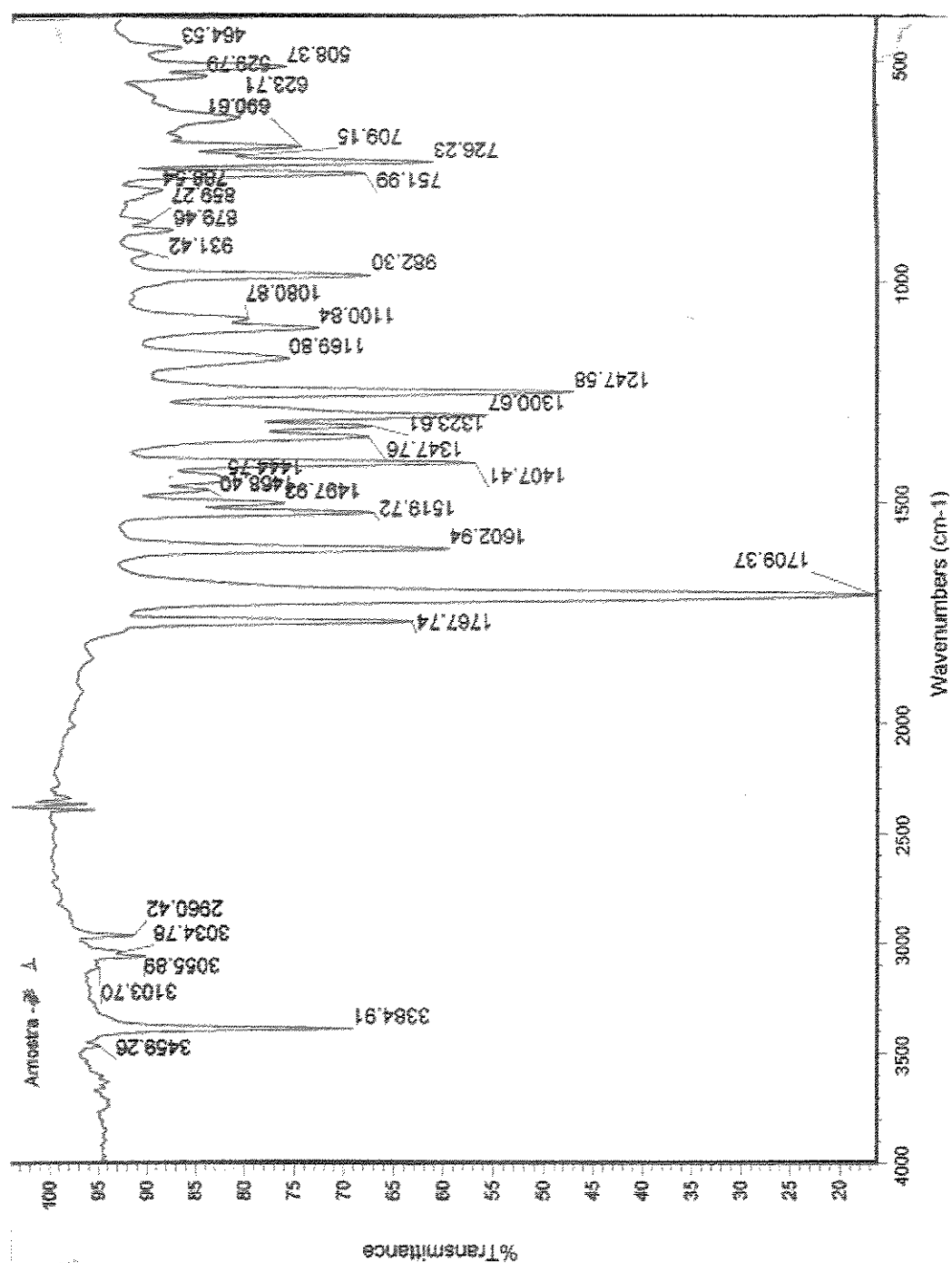


Figura 2. Espectro de Infravermelho da N-(fenil)aminometilftalimida (1).

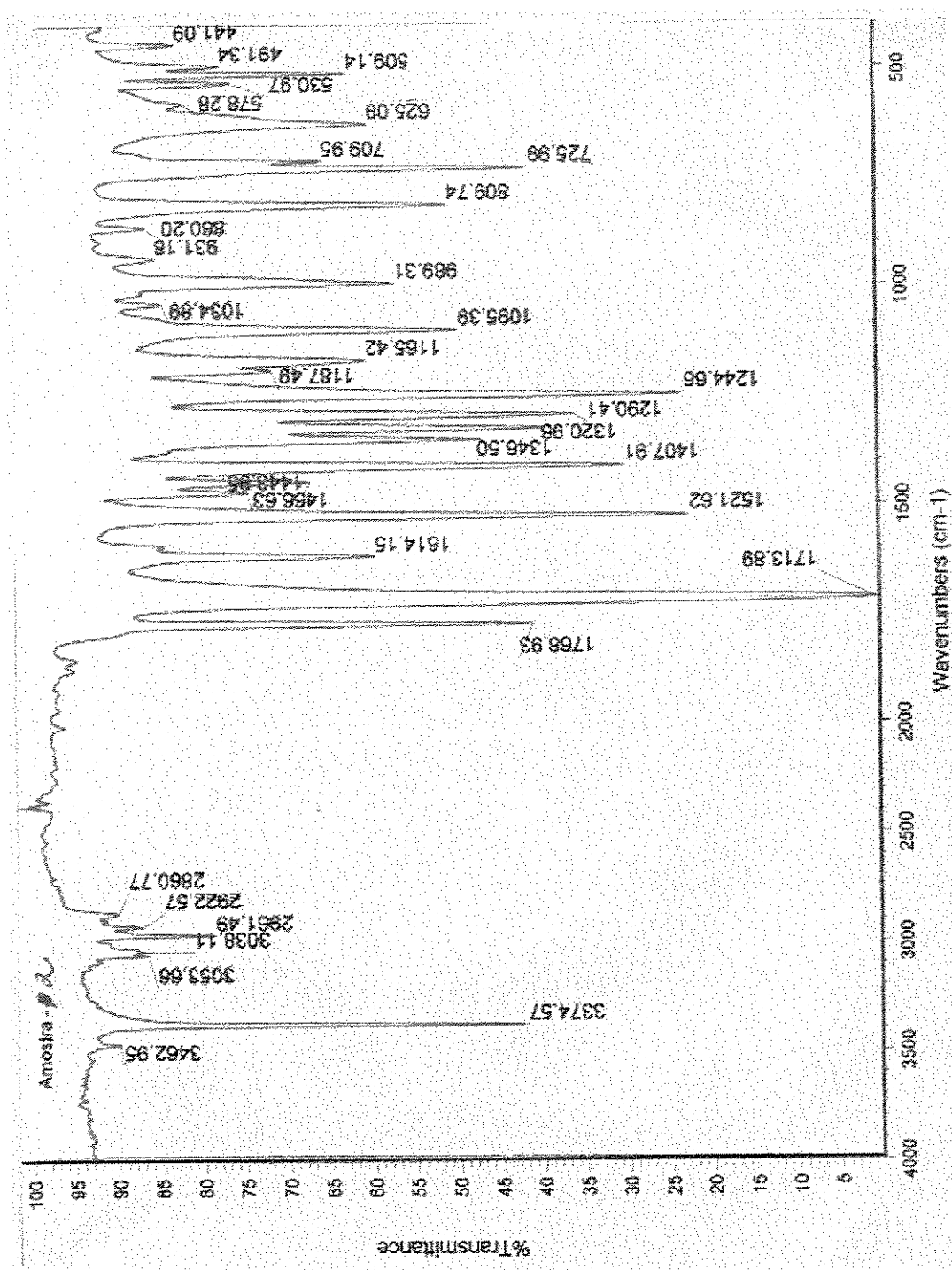


Figura 3. Espectro de Infravermelho da N-(4-metilfenil)aminometilftalimida (2).

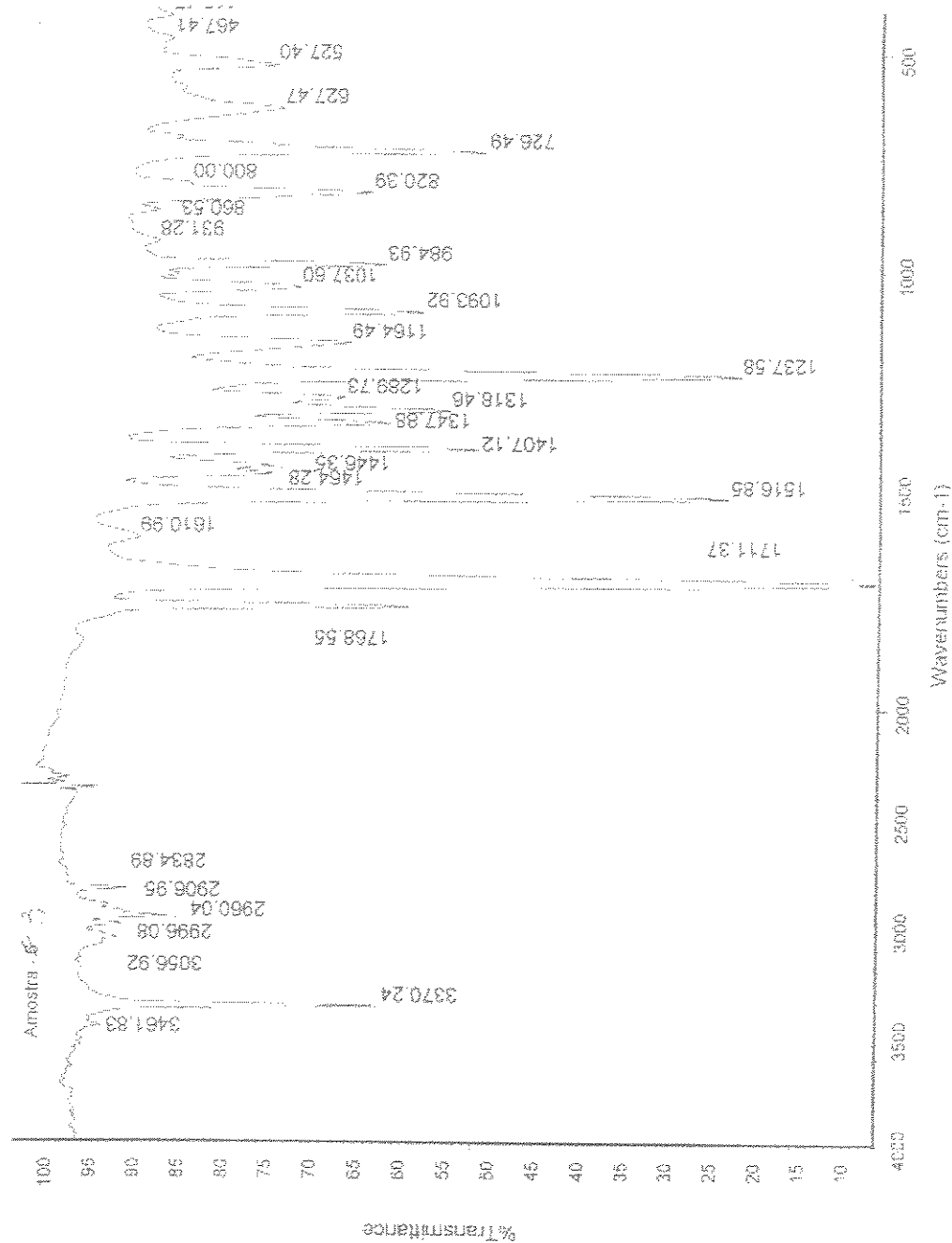


Figura 4. Espectro de Infravermelho da N-(4-metoxifenil)aminometilfthalimida (3).

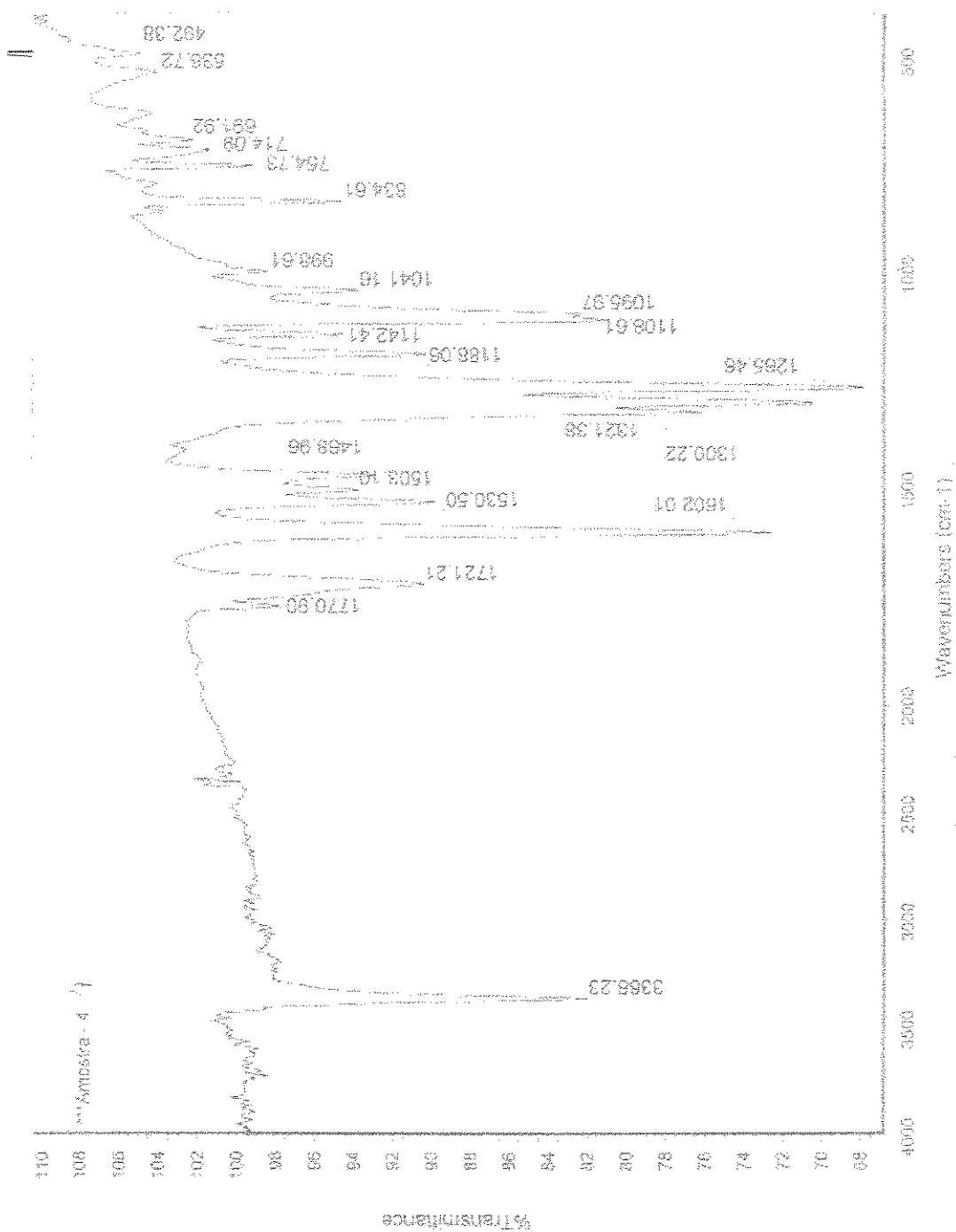


Figura 5. Espectro de Infravermelho da N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4).

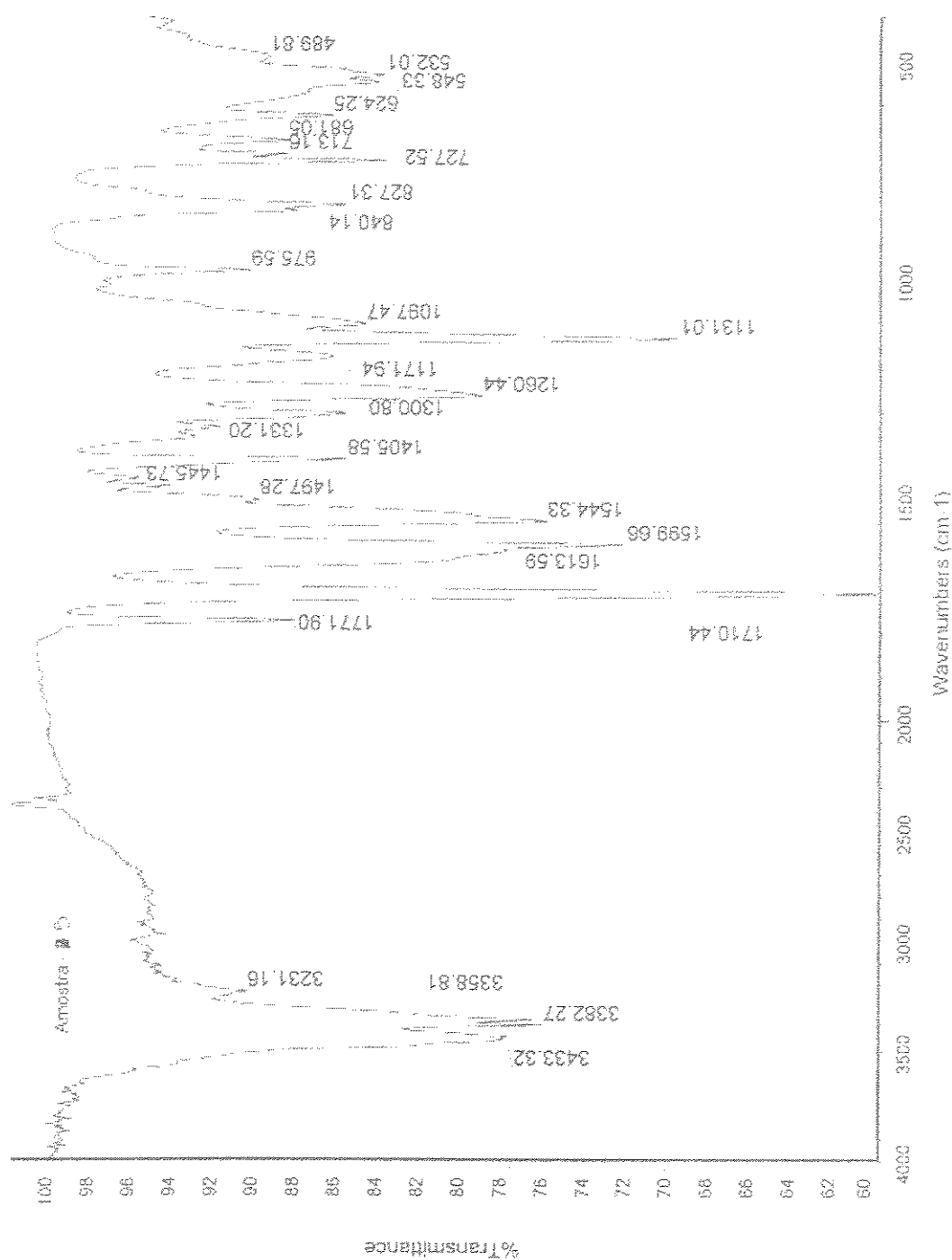


Figura 6. Espectro de Infravermelho da N-(4-benzenosulfonilguanidil)aminometil ftalimida (5).

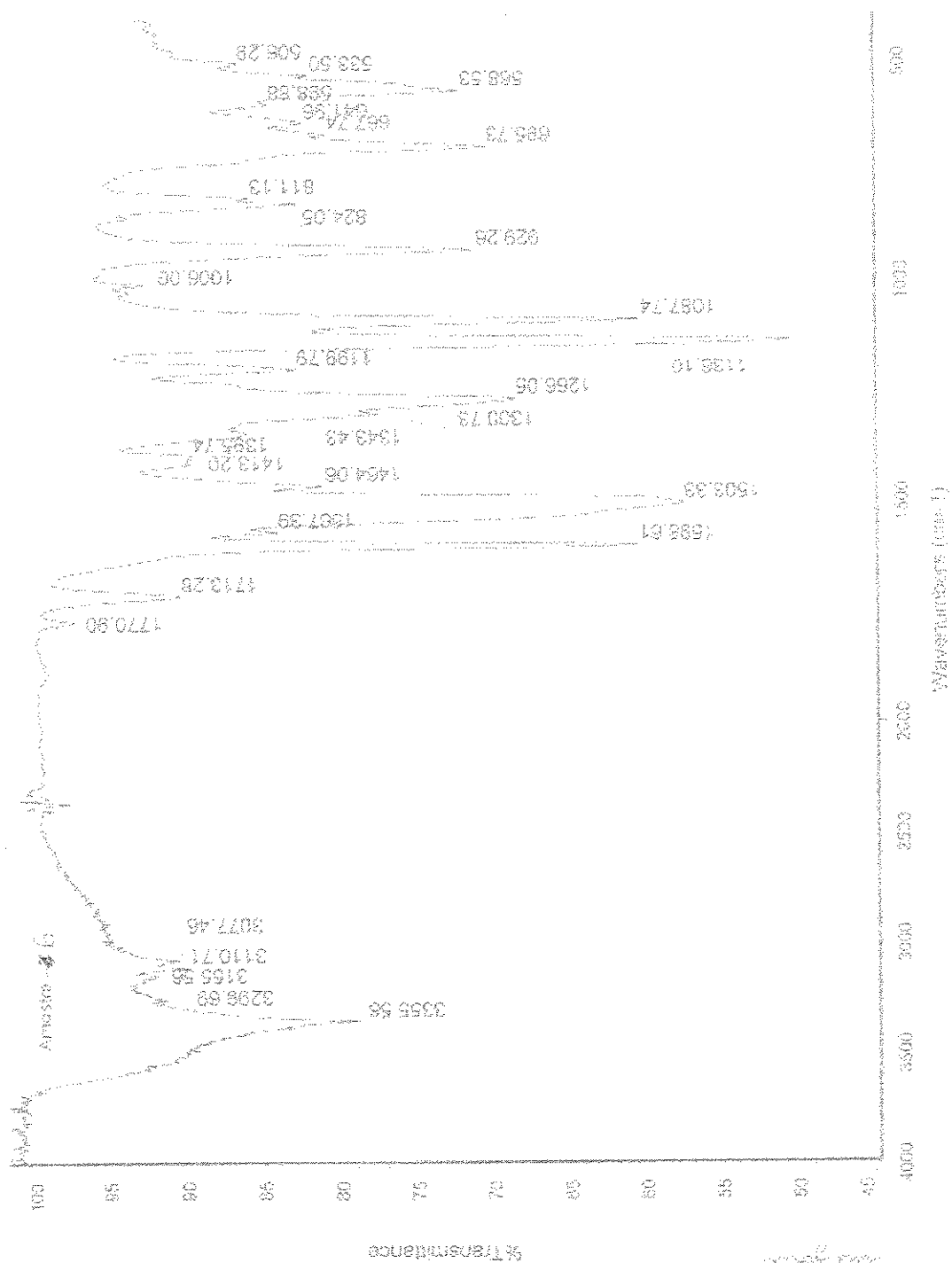


Figura 7. Espectro de Infravermelho da N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil)amino] aminometilftalimida (6).

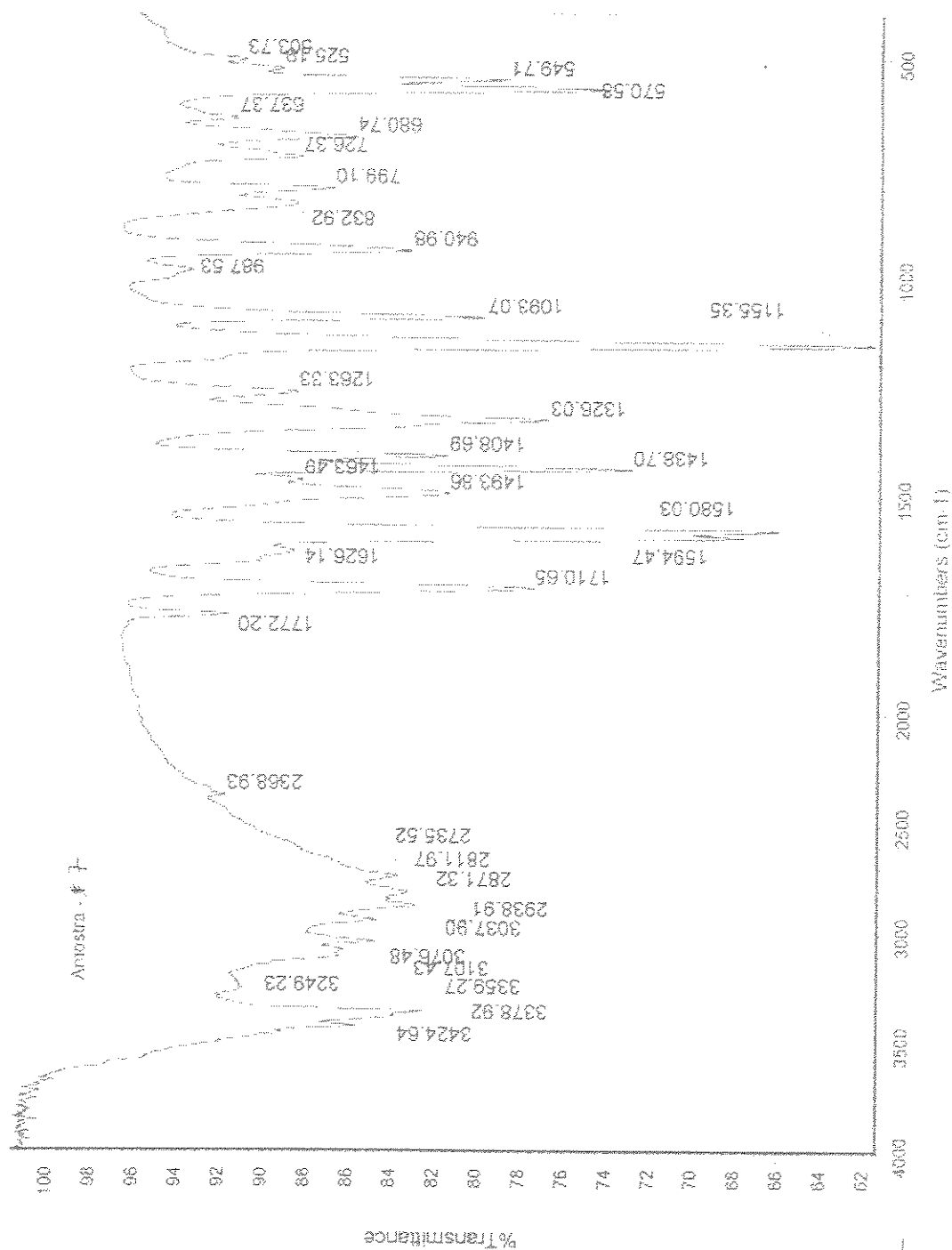


Figura 8. Espectro de Infravermelho da N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil) amino]aminometilftalimida (7).

4.4.2. Ensaio “in vitro”

Analisando a Tabela 2, verifica-se que a substância (3) apresentou melhor atividade em relação à cepa Y do parasito, com uma porcentagem de lise de 96.2% ($IC_{50}=202,8 \mu\text{g/mL}$) a $1000 \mu\text{g/mL}$. Já para a cepa Bolívia, a substância (4) apresentou melhores resultados, com uma atividade de 100% a partir de $500 \mu\text{g/mL}$ ($IC_{50}=8,0 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 2. Avaliação tripanocida “in vitro” dos derivados da N-aminometilftalida sobre as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

Cepa/ Substâncias	% de lise $\pm$ SD X concentração ($\mu\text{g/mL}$)*					IC ₅₀ **
	10	100	250	500	1000	
Cepa Y						
(1)	0.5 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 3.6	9.4 $\pm$ 3.2	35.4 $\pm$ 1.7	67.9 $\pm$ 2.8	686.7
(2)	0.5 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 3.4	30.3 $\pm$ 1.2	37.1 $\pm$ 0.5	65.9 $\pm$ 1.7	635.1
(3)	4.8 $\pm$ 8.3	6.9 $\pm$ 7.0	68.4 $\pm$ 4.2	88.5 $\pm$ 3.8	96.2 $\pm$ 2.3	202.8
(4)	1.8 $\pm$ 3.0	4.6 $\pm$ 7.9	9.4 $\pm$ 8.1	48.1 $\pm$ 8.7	58.5 $\pm$ 11.1	690.9
(5)	4.4 $\pm$ 4.1	25.1 $\pm$ 6.6	34.4 $\pm$ 1.6	35.2 $\pm$ 5.1	33.6 $\pm$ 2.2	3318
(6)	1.1 $\pm$ 1.9	8.8 $\pm$ 12.4	32.8 $\pm$ 11.8	43.7 $\pm$ 6.6	57.4 $\pm$ 2.9	669.9
(7)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	15.8 $\pm$ 14.9	56.8 $\pm$ 7.8	68.3 $\pm$ 5.2	531.2
Cepa Bolívia						
(1)	19.6 $\pm$ 20.7	52.9 $\pm$ 3.9	83.0 $\pm$ 8.2	89.5 $\pm$ 9.9	96.7 $\pm$ 5.6	64.3
(2)	35.9 $\pm$ 26.1	41.8 $\pm$ 15.7	39.8 $\pm$ 29.7	46.4 $\pm$ 14.8	60.8 $\pm$ 17.1	529.6
(3)	39.8 $\pm$ 13.7	63.4 $\pm$ 12.6	67.3 $\pm$ 12.6	76.5 $\pm$ 11.7	79.1 $\pm$ 2.2	28.4
(4)	55.3 $\pm$ 5.6	84.4 $\pm$ 10.0	99.3 $\pm$ 1.3	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	8.0
(5)	52.5 $\pm$ 25.2	58.1 $\pm$ 8.1	65.3 $\pm$ 25.4	84.1 $\pm$ 9.4	85.1 $\pm$ 8.5	12.8
(6)	56,4 $\pm$ 1,2	76,4 $\pm$ 9,3	75,0 $\pm$ 11,8	90,7 $\pm$ 4,5	98,6 $\pm$ 2,5	6,55
(7)	30,7 $\pm$ 20,4	55,7 $\pm$ 10,6	57,8 $\pm$ 14,0	67,1 $\pm$ 28,5	89,3 $\pm$ 7,7	68,9

* controle positivo – violeta de genciana na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$.

** IC_{50} – Coeficiente de inibição

A substância (4), que demonstrou atividade parasitária de 100% de lise, foi logo em seguida, inoculada em camundongos saudáveis. Após 15 dias de infecção estes animais apresentaram-se parasitados, demonstrando a ineficácia da substância (4) na quimioprofilaxia da doença de Chagas.

Embora as substâncias avaliadas não apresentaram resultados efetivos para a quimioprofilaxia da doença de Chagas, podemos considerar que a substância (3) demonstrou possuir considerável potencial tripanocida, em termos de utilização em terapêutica, visto que as avaliações até o momento efetuadas, caracterizam-na com um baixo IC_{50} para as duas cepas do parasito.

Com relação à cepa Bolívia, observa-se na Tabela 2, que praticamente todas as substâncias demonstraram possuir baixo valor de IC_{50} , quando comparados aos valores obtidos para a cepa Y, situação melhor visualizada nas Figuras 9 e 10. Através da análise dos dados obtidos, observa-se claramente maior suscetibilidade das formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia em relação à cepa Y.

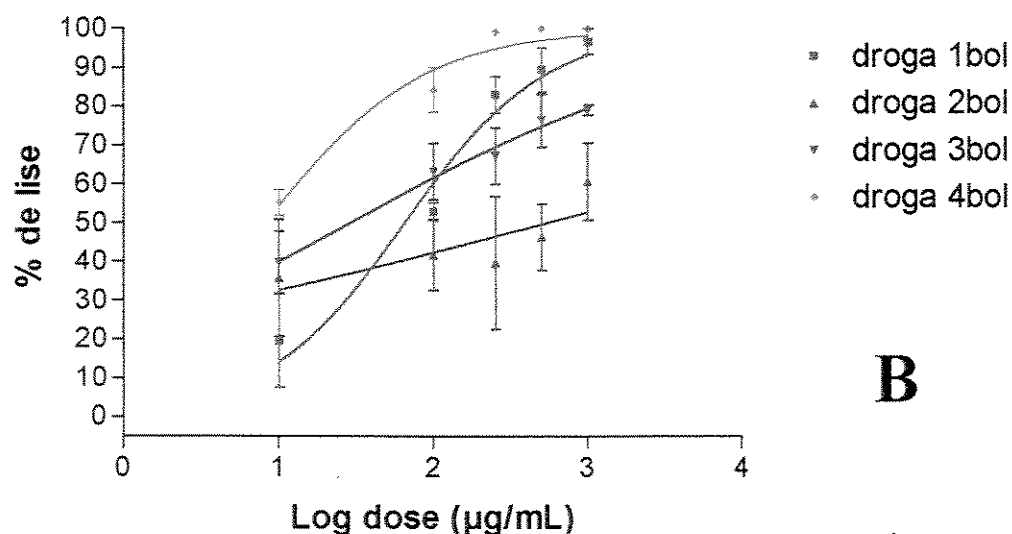
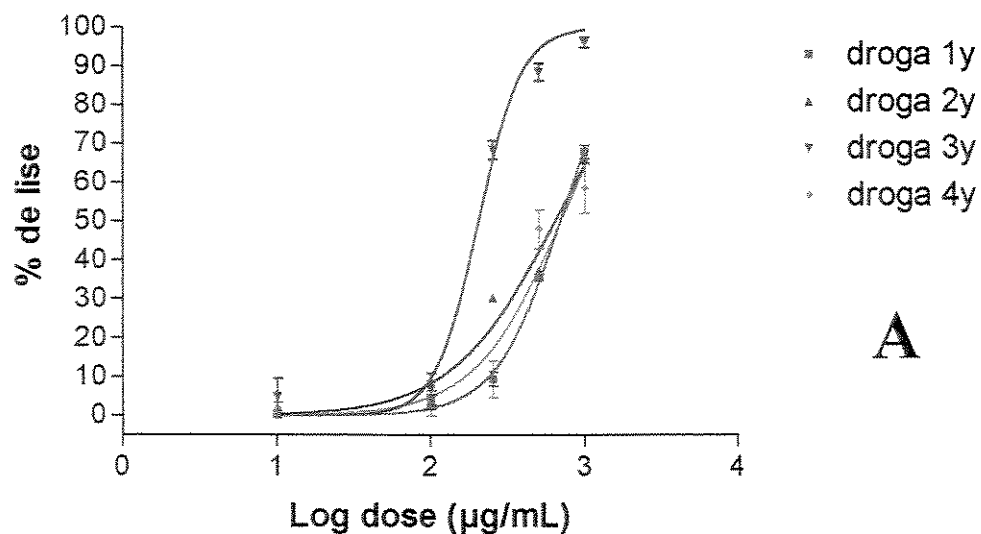


Figura 9. Cálculo do IC_{50} das substâncias N-(fenil)aminometilftalimida (1), N-(4-metilfenil)aminometilftalimida (2), N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3) e N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4), relativo à atividade biológica sobre as cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*.

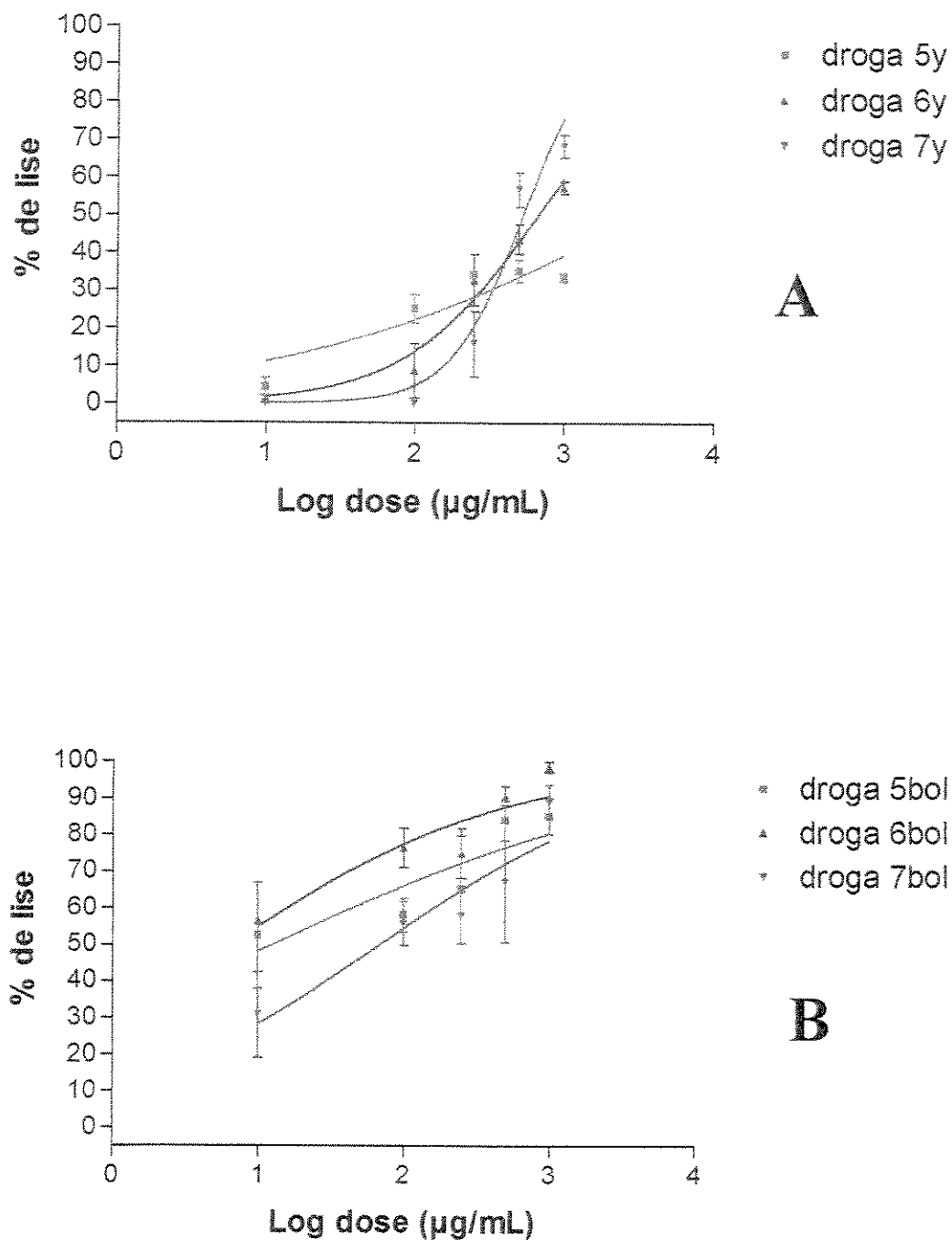


Figura 10. Cálculo do IC_{50} das substâncias N-(4-benzenosulfonilguanidil) aminometilftalimida (5), N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil)amino] amino metilftalimida (6), N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil) amino]aminometil ftalimida (7) relativo à atividade biológica sobre as cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*.

Esse fato retrata as observações feitas por diversos autores (RIBEIRO et al., 1988; ALBUQUERQUE et al., 1991; BRENER, 2000), em relação à diferenciação biológica e comportamental de diferentes populações de *T. cruzi*, que demonstram diferentes suscetibilidades aos agentes quimioterápicos. Este tipo de comportamento freqüentemente determina a baixa eficácia de várias substâncias aplicadas ao tratamento de diferentes grupos populacionais, provenientes de diferentes regiões geográficas (ANDRADE et al., 1992). Como foi demonstrada em relação ao Bay 2502, a resposta ao tratamento pode ser influenciada pela cepa do parasito (ANDRADE et al., 1975).

Em relação aos ensaios “in vitro” sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi verificada a atividade sobre as cepas Y e Bolívia do parasito, sendo os resultados apresentados nas Figuras 11 a 24.

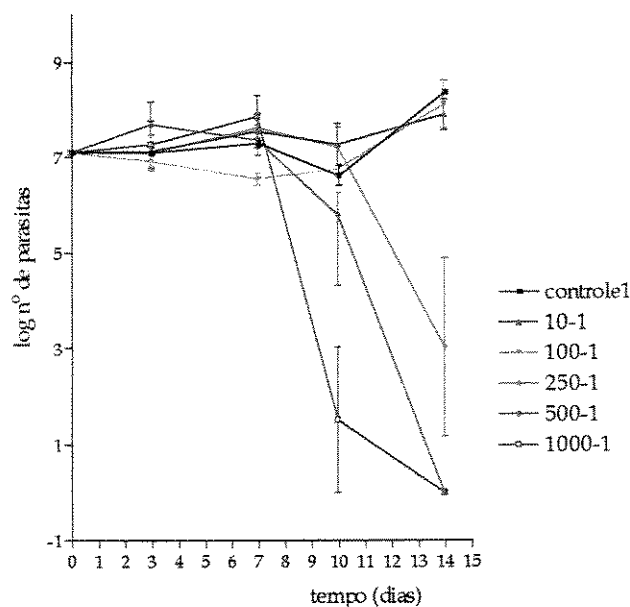


Figura 11. Avaliação da substância N-(fenil)aminometil flalimida (1) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

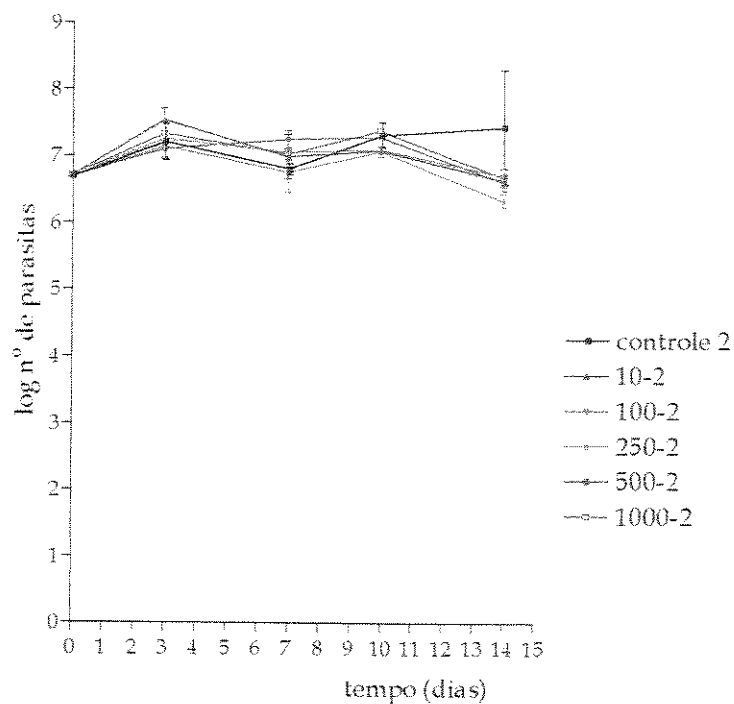


Figura 12. Avaliação da substância N-(4-metilfenil)aminometilftalimida (2) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

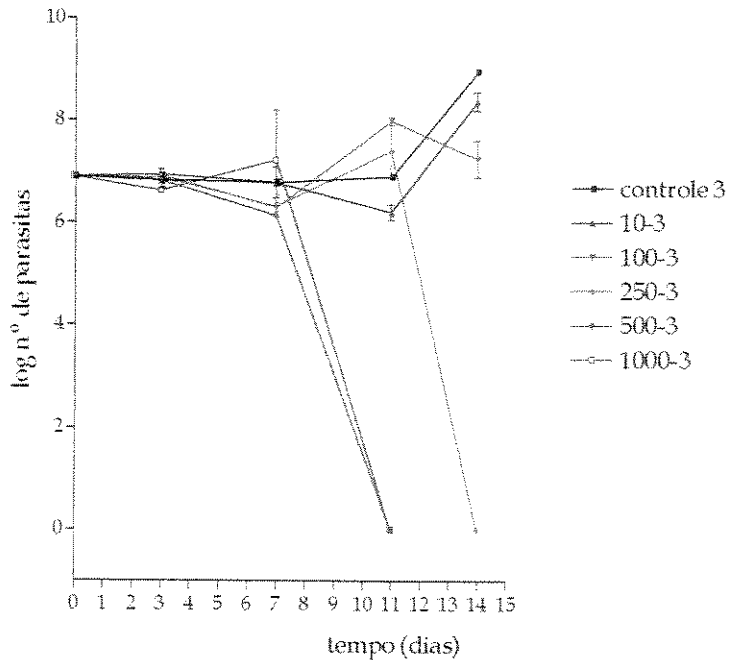


Figura 13. Avaliação da substância N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

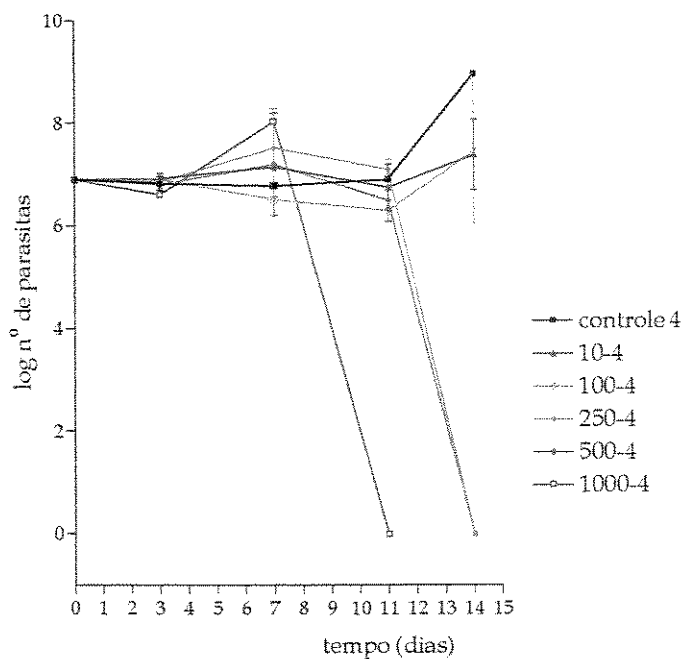


Figura 14. Avaliação da substância N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

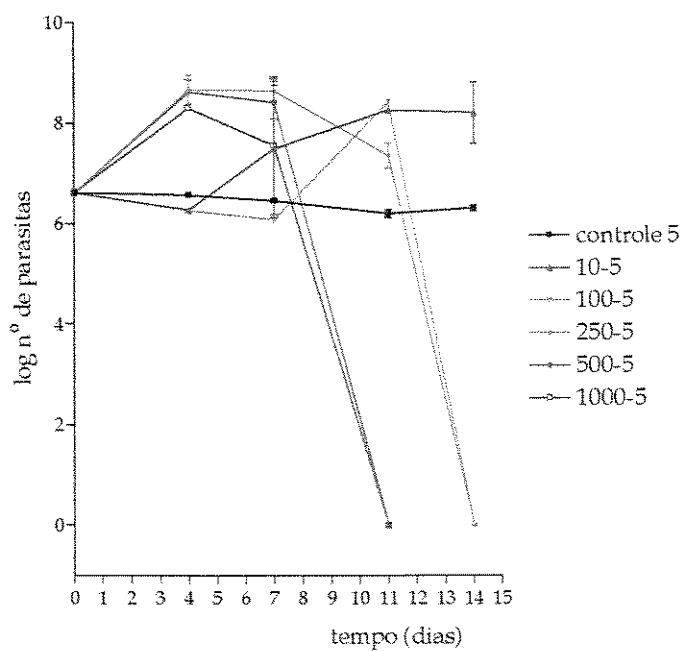


Figura 15. Avaliação da substância N-(4-benzenosulfonilguanidil)aminometilftalimida (5) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

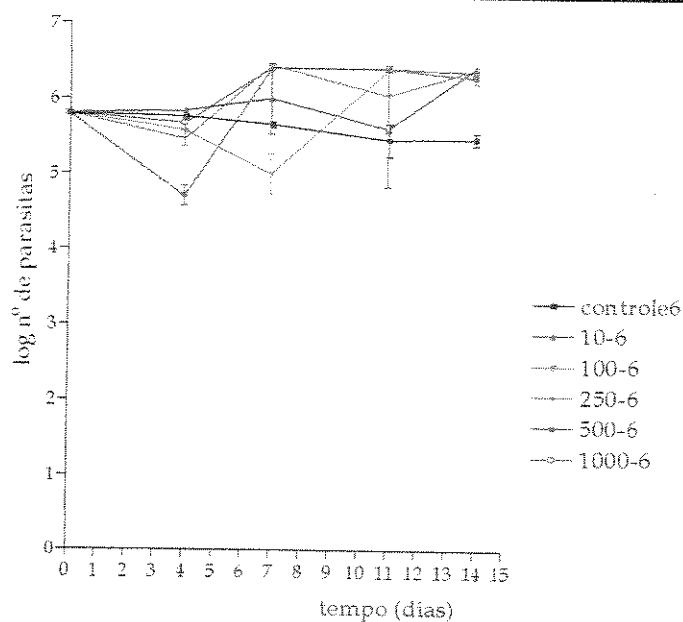


Figura 16. Avaliação da substância N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil)amino]aminometilftalimida (6) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

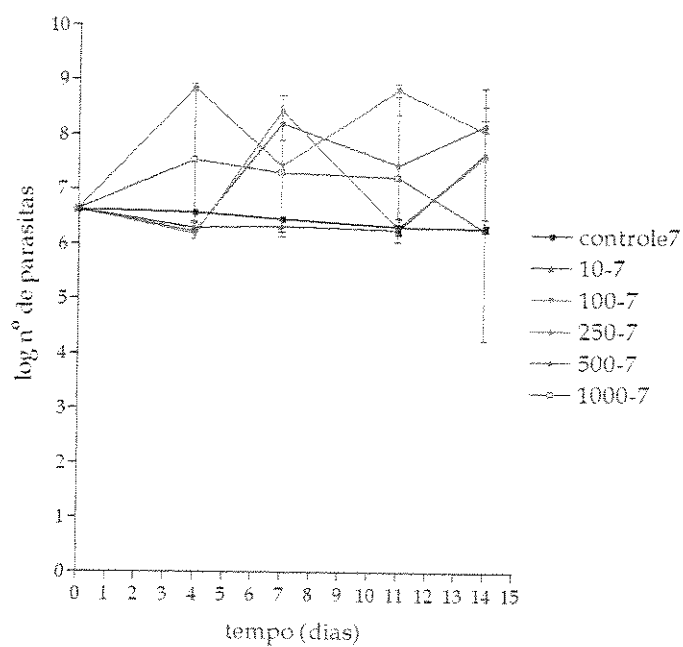


Figura 17. Avaliação da substância N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino]aminometilftalimida (7) sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

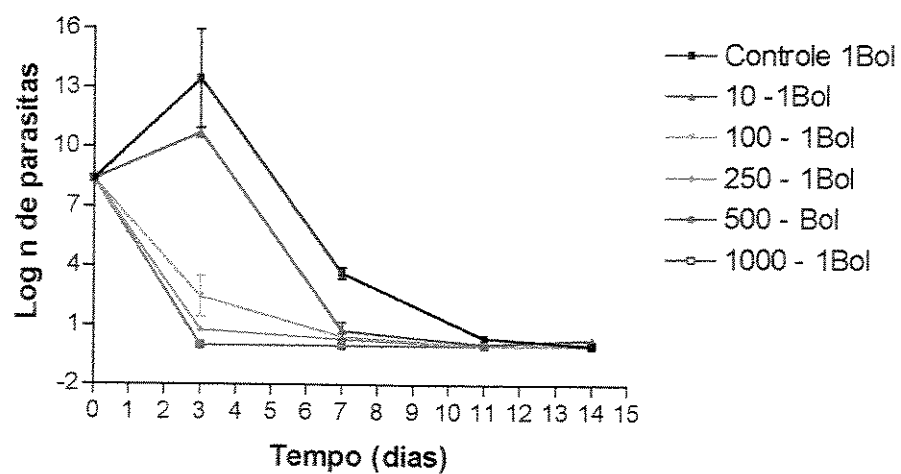


Figura 18. Avaliação da substância N-(fenil)aminometilftalimida (1) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

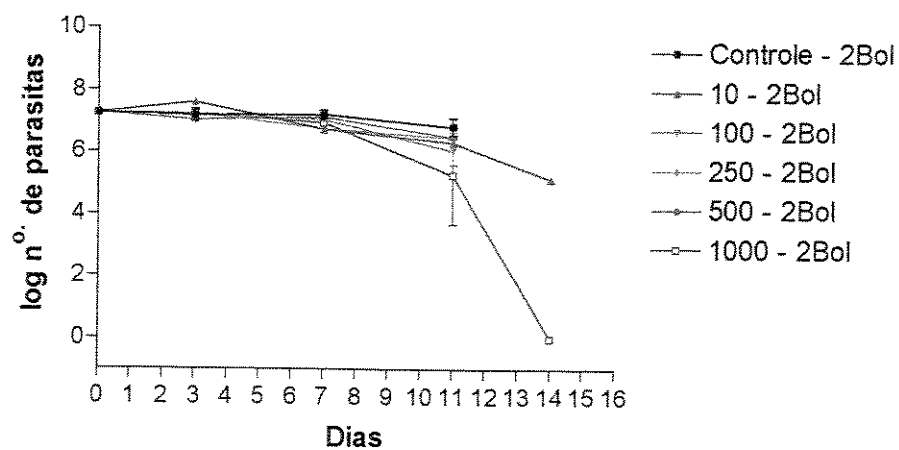


Figura 19. Avaliação da substância N-(4-metilfenil)aminometilftalimida (2) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

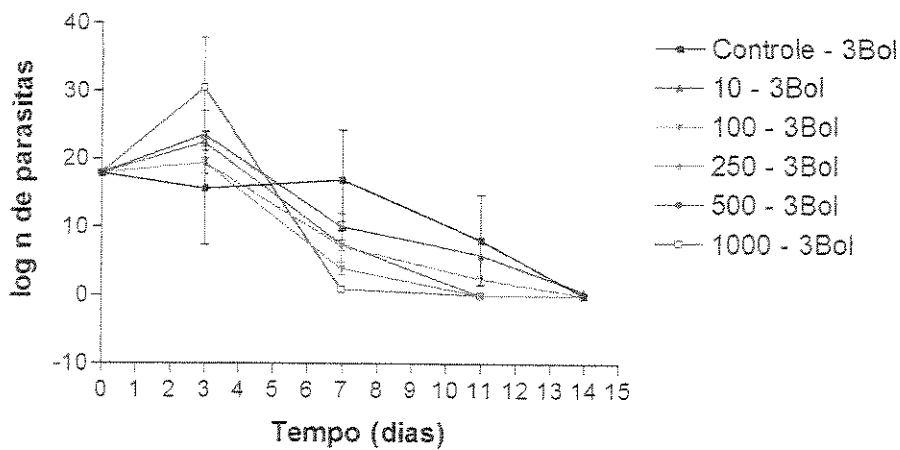


Figura 20. Avaliação da substância N-(4-metoxifenil)aminometilftalimida (3) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

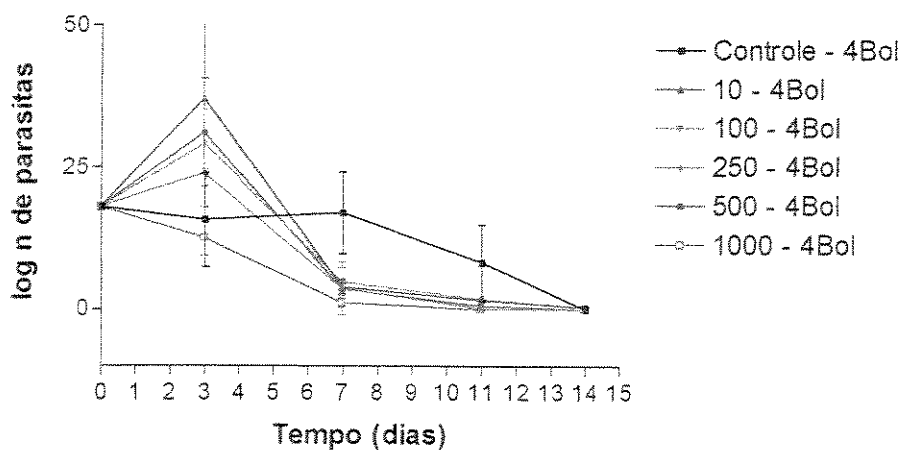


Figura 21. Avaliação da substância N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida (4) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

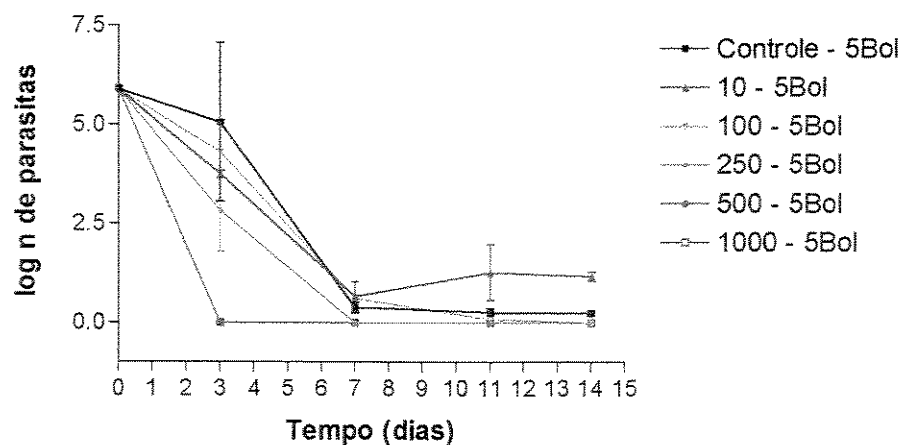


Figura 22. Avaliação da substância N-(4-benzenosulfonilguanidil)amino metilftalimida (5) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

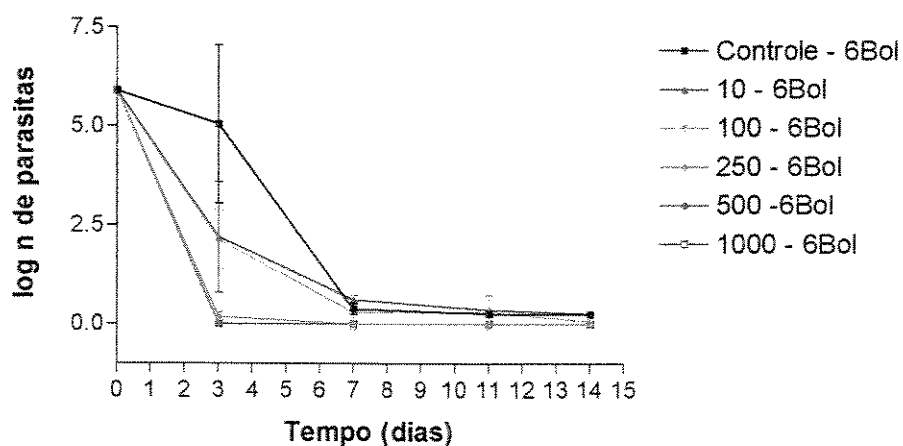


Figura 23. Avaliação da substância N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil)amino]aminometilftalimida (6) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

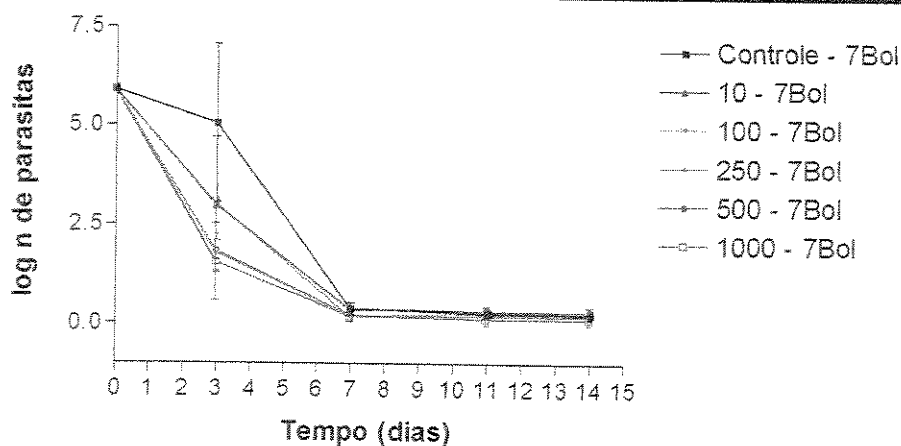


Figura 24. Avaliação da substância N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino]aminometilftalimida (7) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

Através dos dados obtidos para a cepa Y de *T. cruzi*, as substâncias (6) e (7) mostraram-se inativas frente ao desenvolvimento do parasito, e a (2) demonstrou-se inativa para ambas as cepas, quando comparadas ao grupo controle.

As substâncias (1), (3), (4) e (5) apresentaram nítida atividade biológica a partir da concentração de 250µg/mL, promovendo inibição total do desenvolvimento das formas epimastigotas da cepa Y e, as substâncias (1), (5), (6) e (7) demonstraram atividade sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia.

Com relação às substâncias (3) e (4), verificamos a inibição do desenvolvimento das formas epimastigotas da cepa Bolívia após o 3º. dia de incubação, a partir da concentração de 250µg/mL, quando a comparamos ao grupo controle e às demais substâncias.

Diferentemente dos resultados obtidos em relação às formas tripomastigotas, é nítida a observação de uma maior suscetibilidade das formas epimastigotas à ação das substâncias avaliadas.

Através dos resultados apresentados por LANE et al. (1996), as diferenças de suscetibilidade das cepas de *T. cruzi* induzem o questionamento sobre a eficácia na triagem de substâncias utilizando formas epimastigotas em cultivo como modelo experimental, visto que essas formas, demonstraram maior sensibilidade à ação de substâncias, quando comparada às formas tripomastigotas.

Por outro lado, CONTI et al. (1996) relatam maior suscetibilidade das formas tripomastigotas em relação as epimastigotas quando avaliados vários derivados de 3-(4-bromo-[1,1-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amino.

Estas conclusões não excluem a possibilidade da utilização de meio de cultivo axênico na averiguação da atividade biológica sobre *T. cruzi*, mas sim alertar para a problemática da diferença de sensibilidade entre as formas do parasito, bem como considerar a importância destes meios na elucidação de mecanismos de ação de substâncias, principalmente no que diz respeito ao comportamento fisiológico do parasito.

5. CAPÍTULO II

Atividade Tripanocida “in vivo” de derivados da N-aminometilftalimida, sobre duas diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

5.1. Resumo

A avaliação tripanocida dos derivados da N-aminometilftalimida, foi verificada em ensaios biológicos “in vivo”, utilizando como modelo experimental diferentes grupos de camundongos *Mus musculus* infectados com a cepa Y e Bolívia de *Trypanosoma cruzi*. Para análise do parasitismo tecidual e prováveis efeitos toxicológicos das substâncias testadas, foi realizada a avaliação histopatológica do coração, fígado e baço. Através deste estudo, verificaram-se as diferenças na suscetibilidade das cepas do parasito submetidas ao tratamento, bem como ausência da cura parasitológica.

5.2. Introdução

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta patogenia com características próprias do hospedeiro e da população infectante. Assim, o curso da infecção nos invertebrados suscetíveis é influenciado por fatores como a idade, o sexo, a constituição genética do hospedeiro, além das características genéticas e morfológicas da cepa infectante (BRENER, 1962).

Diferentes cepas de *T. cruzi*, apresentam preferências quanto ao tipo de hospedeiros, distribuição geográfica, características morfológicas e genéticas, comportamento biológico resultando em distintos cursos da parasitemia, virulência e tropismo tecidual (BICE & ZELEDÓN, 1970; BRAUN & TITTO, 1985; DIEGO et al., 1991; ZINGALES, 2000). Fatores que influenciam diretamente o encontro de uma substância eficaz de combater o parasito (ANDRADE, 1985).

As cepas de *T. cruzi* podem ser classificadas em três tipos ou Zimodemas de acordo com o seu comportamento morfológico e histopatológico, em camundongos (ANDRADE et al., 1985a; ANDRADE, 1990).

Atualmente o nifurtimox e o benzonidazol, dois compostos nitro derivados, tem sido utilizados no tratamento desta doença. Entretanto ambos produzem vários efeitos colaterais; tais como os mutagênicos, além da variabilidade de sensibilidade apresentada pelas cepas de *T. cruzi*, ora sensíveis, ora resistentes a estas substâncias (ANDRADE et al., 1992; MAYA et al., 1997). Além disso, o tratamento com benzonidazol resulta na diminuição da sintomatologia clínica e parasitemia, mas não promove alterações favoráveis no quadro evolutivo da histopatologia da doença chagásica cardíaca (INGLESSIS et al., 1998).

Sendo assim, neste trabalho foi avaliada a atividade tripanocida de derivados da ftalimida, sobre duas diferentes cepas de *T. cruzi*, por meio de ensaio biológico “in vivo”, através de avaliação das alterações histopatológicas determinadas pelo parasitismo e mensuração da toxicidade das substâncias avaliadas.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Síntese das substâncias testadas

Utilizando a metodologia descrita por WISTEAD & HEINE (1955), os derivados da N-aminometilftalimida foram sintetizados através da reação da N-aminoftalimida com amidas aromáticas.

Em capela, foram adicionados em um erlenmeyer, piridina e a N-aminoftalimida. Ao sistema, em constante agitação, foi adicionada lentamente a amida aromática. Após o término da adição, o sistema foi fechado com rolha de borracha, e a agitação foi mantida até não se observar mais a presença de sólido no sistema. Em seguida, foi adicionada água destilada em excesso, com a finalidade de interromper a reação e promover a precipitação da amida. A amida obtida foi filtrada em büchner, lavada com excesso de água destilada e secada à temperatura ambiente.

A avaliação do desenvolvimento da reação entre N-aminoftalimida e amidas aromáticas foi realizada através dos intervalos de fusão e espectro de infra-vermelho.

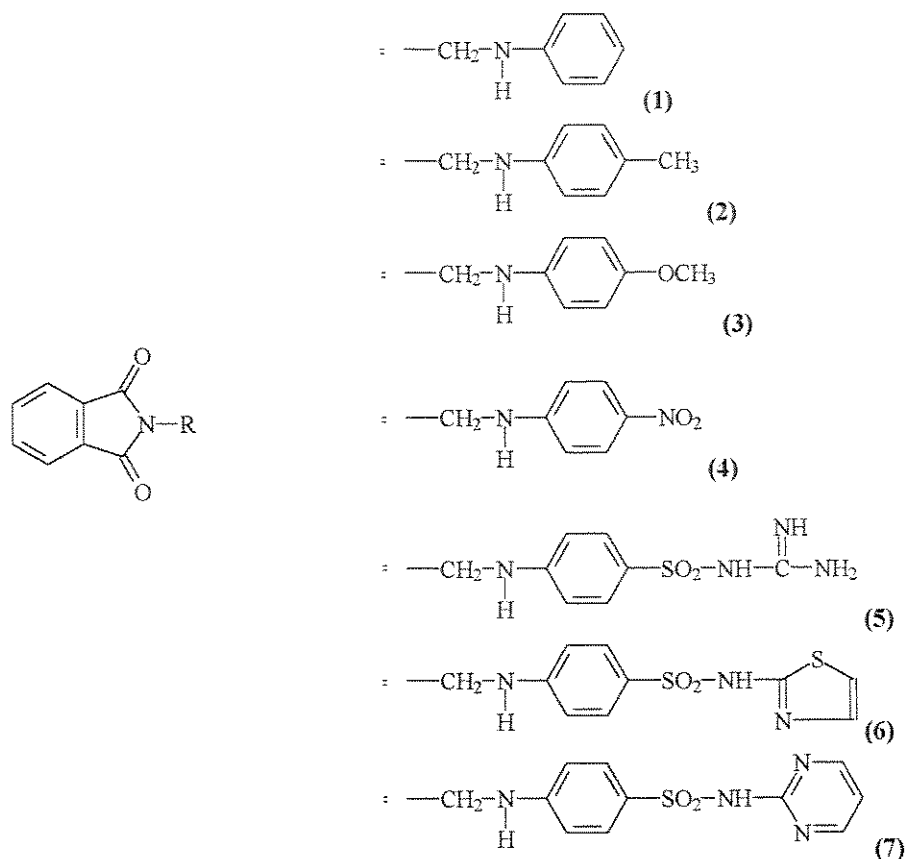


Figura 1. Aspecto estrutural dos derivados da ftalimida avaliados: (1).N-(fenil)amino metilftalimida; (2).N-(4-metilfenil)aminometilftalimida; (3).N-(4-metoxifenil) aminometilftalimida; (4).N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida; (5).N-(4-benzeno sulfonilguanidil) aminometilftalimida; (6).N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil) amino]aminometilftalimida; (7).N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino] aminometilftalimida

5.3.2.Cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas

5.3.2.1. Cepa Y

Cepa do parasita, isolada de um paciente chagásico na fase aguda da infecção, por PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG em 1953. Esta cepa apresenta

predominância de formas delgadas (Figura 2A) e tropismo tecidual diferenciado para as células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com frequência esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea (ANDRADE, 1976). De acordo com estas características, a cepa Y foi classificada como *T. cruzi* II, equivalente ao Zimodema II por MILES et al. (1980) e Linhagem 1 por SOUTO et al. (1996).

5.3.2.2. Cepa Bolívia

Isolada do *Triatoma vitticeps* capturado em Vitichi, na Bolívia, em 1974 (FUNAYAMA & PRADO JÚNIOR, 1974). Apresenta característica morfológica larga (Figura 2B), marcante tropismo para células musculares (músculo liso, esquelético e cardíaco) e tecido glandular. Sendo assim, esta cepa pertence ao grupo *T. cruzi* I, equivalente ao Zimodema I (MILES et al., 1980) e Linhagem 2 (SOUTO et al., 1996).

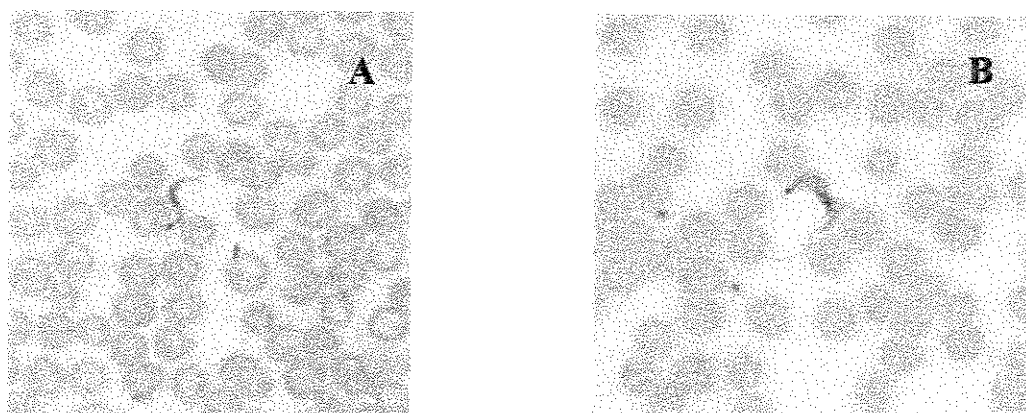


Figura 2. Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*, colhidas no pico de parasitemia de *Mus musculus* infectados. A – cepa Y; B – cepa Bolívia (x 1000 – Giemsa).

5.3.3. Ensaio Biológico “in vivo”

5.3.3.1. Grupos de animais

Foram utilizados três grupos de camundongos albinos, machos, linhagem SWISS, pesando de 20 – 23g cada, demonstrados na Tabela 1.

O grupo II, foi utilizado para a avaliação do comportamento parasitêmico das diferentes cepas em relação ao hospedeiro vertebrado. Após 48h da inoculação intraperitonealmente de 2×10^4 parasitas. Os animais pertencentes ao subgrupo GII(2) foram submetidos ao tratamento diário, pela via intraperitoneal, utilizando-se as dosagens de 8 mg/kg para o benzonidazol – controle positivo (BRENER, 1984; FILARDI & BRENER, 1987) e os animais do subgrupo GII(3) receberam o tratamento com os derivados da Ftalimida, durante 10 dias para a cepa Y e 20 dias para a cepa Bolívia.

O 3º grupo denominado Tratamento Paralelo, contendo 70 animais foi subdividido em 7 subgrupos, com 10 animais cada. Estes camundongos não foram infectados, apenas tratados da mesma maneira que os subgrupos III e IV, pertencentes aos 1º e 2º grupos, a fim de avaliar a toxicidade das substâncias testadas.

5.3.4. Estudo Histopatológico

Camundongos de cada subgrupo foram sacrificados no dia do pico da parasitemia (7^o. dia para a cepa Y e 14^o. dia para a cepa Bolívia). Os animais pertencentes aos subgrupos do Tratamento Paralelo foram submetidos ao mesmo procedimento, para avaliação dos efeitos de toxicidade ao tratamento à curto e à longo prazo.

Em seguida, foram retirados baço, fígado e coração, sendo os mesmos fixados em Alfac por 24h, sendo posteriormente processados histologicamente. Foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e corados pela hematoxilina – eosina. A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70µm, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CAMARGOS et al., 2000).

5.3.4.1. Parasitismo

O grau de parasitismo foi estimado através da análise qualitativa, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X). Para análise, utilizou-se 3 lâminas de cada órgão dos subgrupos. (CASTRO & BRENER, 1985).

Consideraram-se como (+++++) os cortes em que mais de 50% dos campos apresentavam-se parasitados, (++++) cortes onde foram encontrados ninhos de amastigotas em 25% a 50% dos campos, (++) cortes que apresentaram entre 12,5% a 25% de positividade nos campos analisados, (+) quando foram encontrados menos de 12,5% dos

campos parasitados e (-) ausência de ninhos de amastigotas (CASTRO & BRENER, 1985; PENIN et al., 1996; ANDRADE et al., 1997).

5.3.4.2. Análise morfométrica

Além da avaliação do grau de parasitismo e toxicidade das substâncias, foram realizadas as medidas morfométricas dos órgãos dos animais pertencentes a cada subgrupo. Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico, em objetiva de imersão (1000X) munido de uma câmara de captura de imagens e vídeo. Estas imagens capturadas foram projetadas em programa de computador (KS100 – Zeiss), para a realização dos cálculos dos respectivos parâmetros: diâmetro nuclear, perímetro nuclear, relação diâmetros maior e menor (D/d), área nuclear, volume nuclear, relação área/volume (A/v), coeficiente de forma, índice de contorno nuclear e excentricidade.

5.3.5. Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados deste trabalho, assim como para diversos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos morfométricos dos dados, foram utilizados diversos programas para computador do tipo IBM-PC, em linguagem BASIC AVANÇADO (BASICA) desenvolvidos no Departamento de Estomatologia da Faculdade

Kruskal-Wallis, para determinar a significância da atividade das substâncias nos ensaios “in vivo”, e para determinação dos estudos morfométricos, Mann-Whitney e mediana (ALBUQUERQUE, 1995; ABRAHÃO, 2000).

5.4.Resultados e Discussão

5.4.1.Síntese das substâncias testadas

A comprovação da pureza das substâncias, foi efetuada pela comparação dos resultados obtidos pela determinação do intervalo de fusão e Espectroscopia de Infravermelho com padrões pré-existentis (NASI, 1989). Estes resultados estão representados na Tabela (2).

Tabela 2. Determinação dos intervalos de fusão dos derivados de N-aminometilftalimida.

Substância	Intervalo de Fusão (°C)
(1)	146 - 148
(2)	174 - 175
(3)	144 - 145
(4)	234 - 235
(5)	212 - 214
(6)	220 - 222
(7)	238 - 241

5.4.2.Ensaio Biológico “in vivo”

Com relação à atividade dos derivados da N-aminometilftalimida nos ensaios biológicos “in vivo”, não foi possível verificar o mesmo nível de atividade biológica daqueles testes “in vitro”. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 3 a 9.

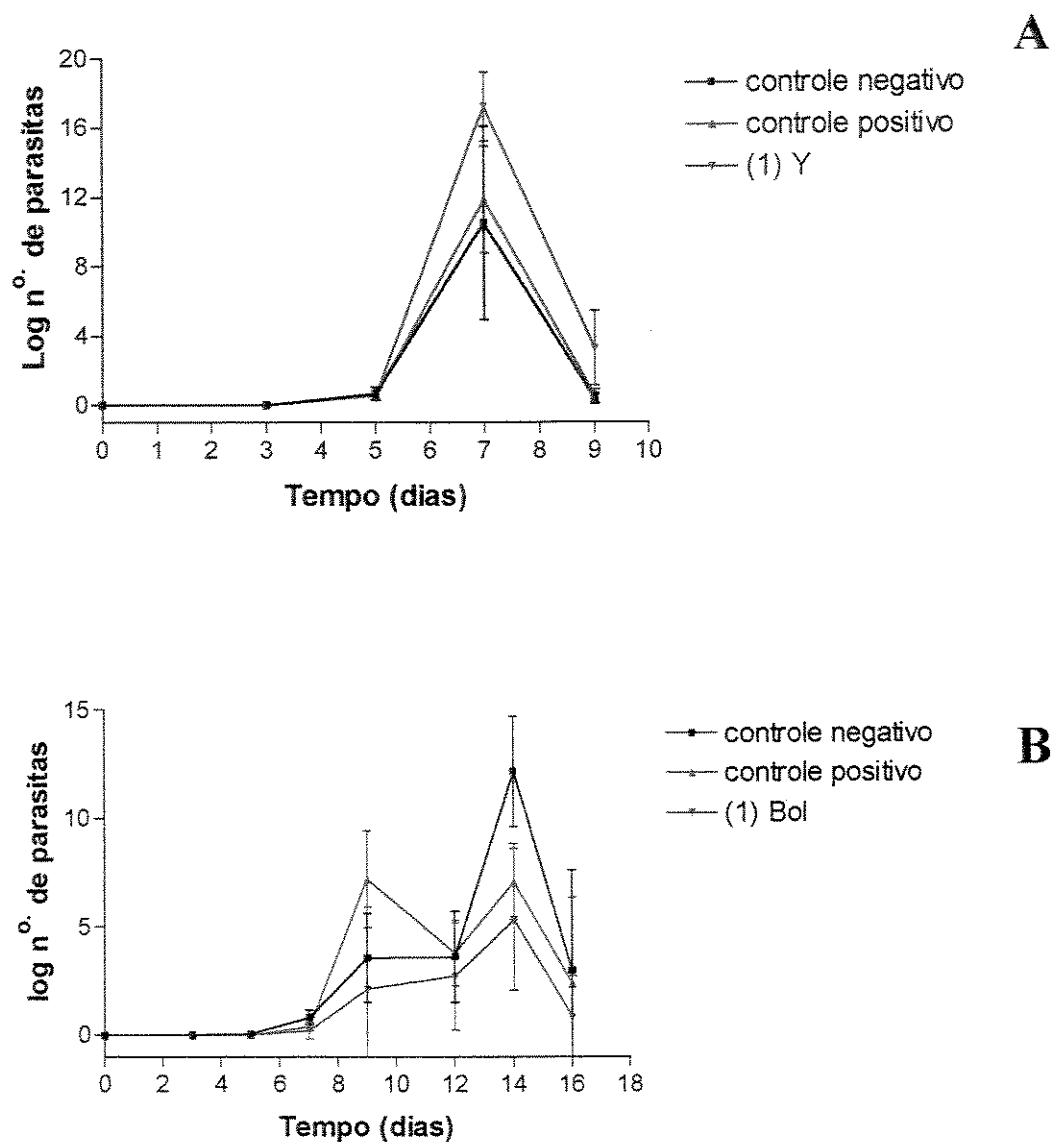


Figura 3. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-(fenil)aminometil ftalimida (1), na dosagem de 8 mg/kg.

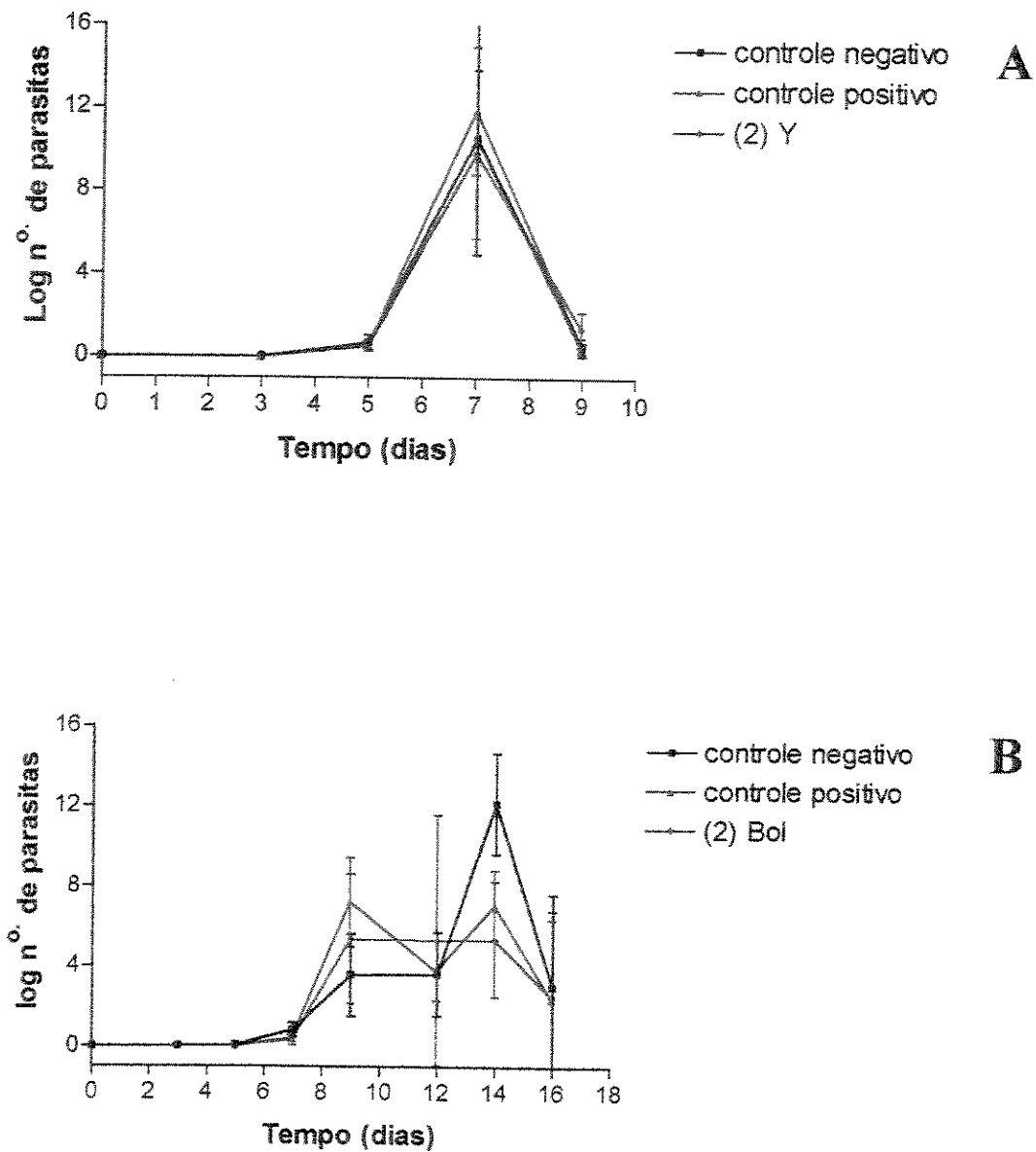


Figura 4. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-(4-metilfenil) aminometilftalimida (2), na dosagem de 8 mg/kg.

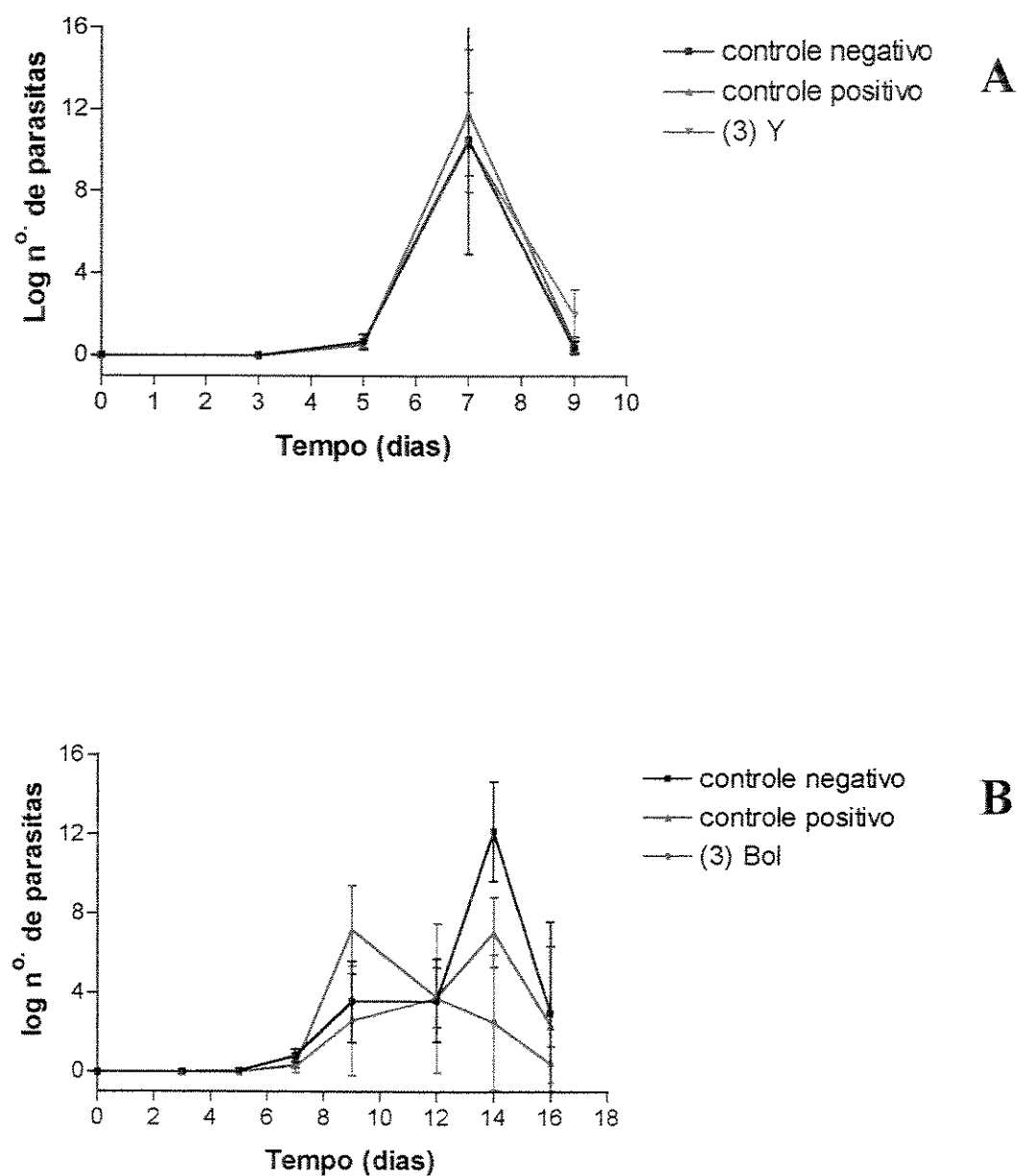


Figura 5. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-(4-metoxifenil) aminometilftalimida (3), na dosagem de 8 mg/kg.

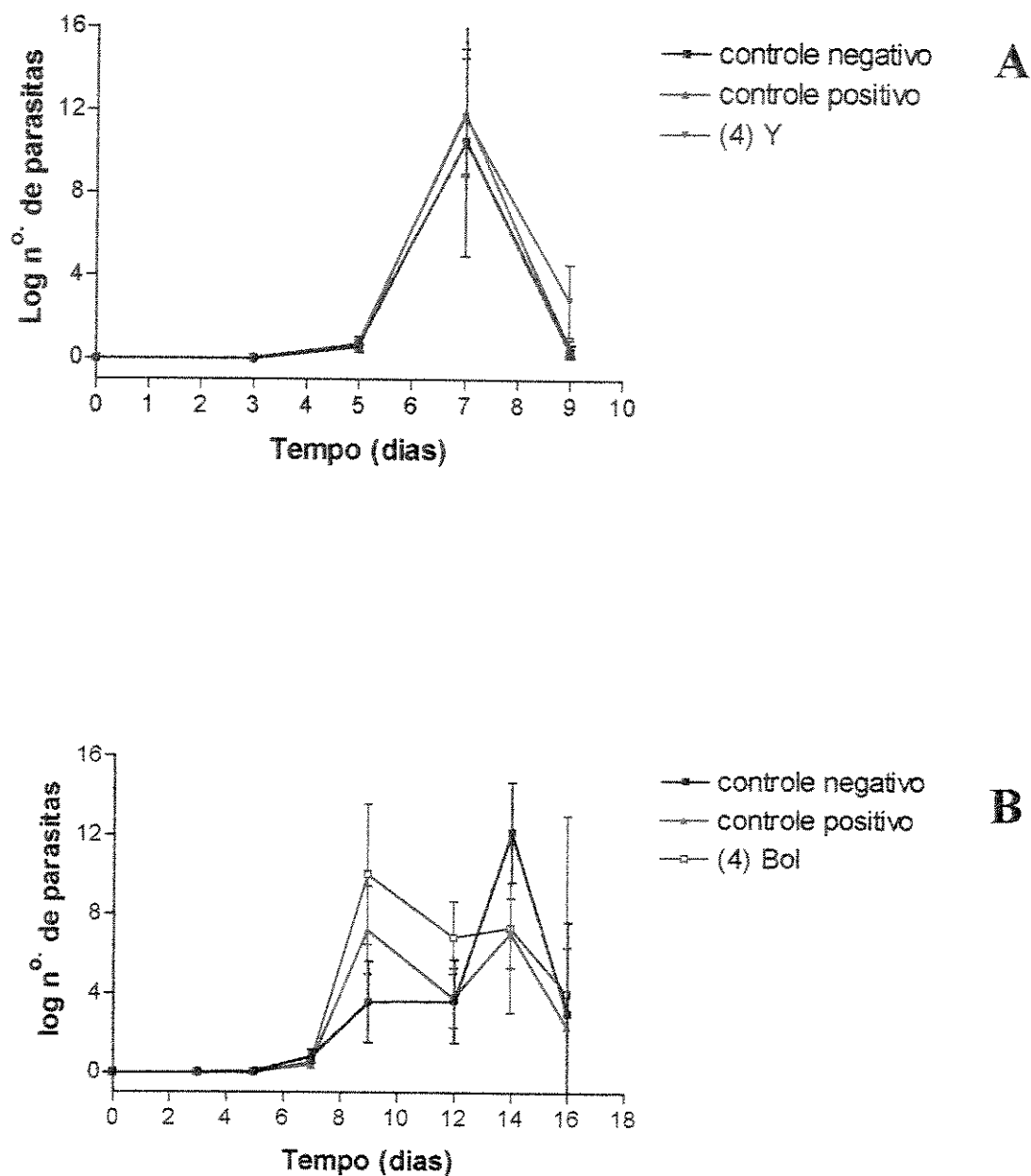


Figura 6. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-(4-nitrofenil) aminometilftalimida (4), na dosagem de 8 mg/kg.

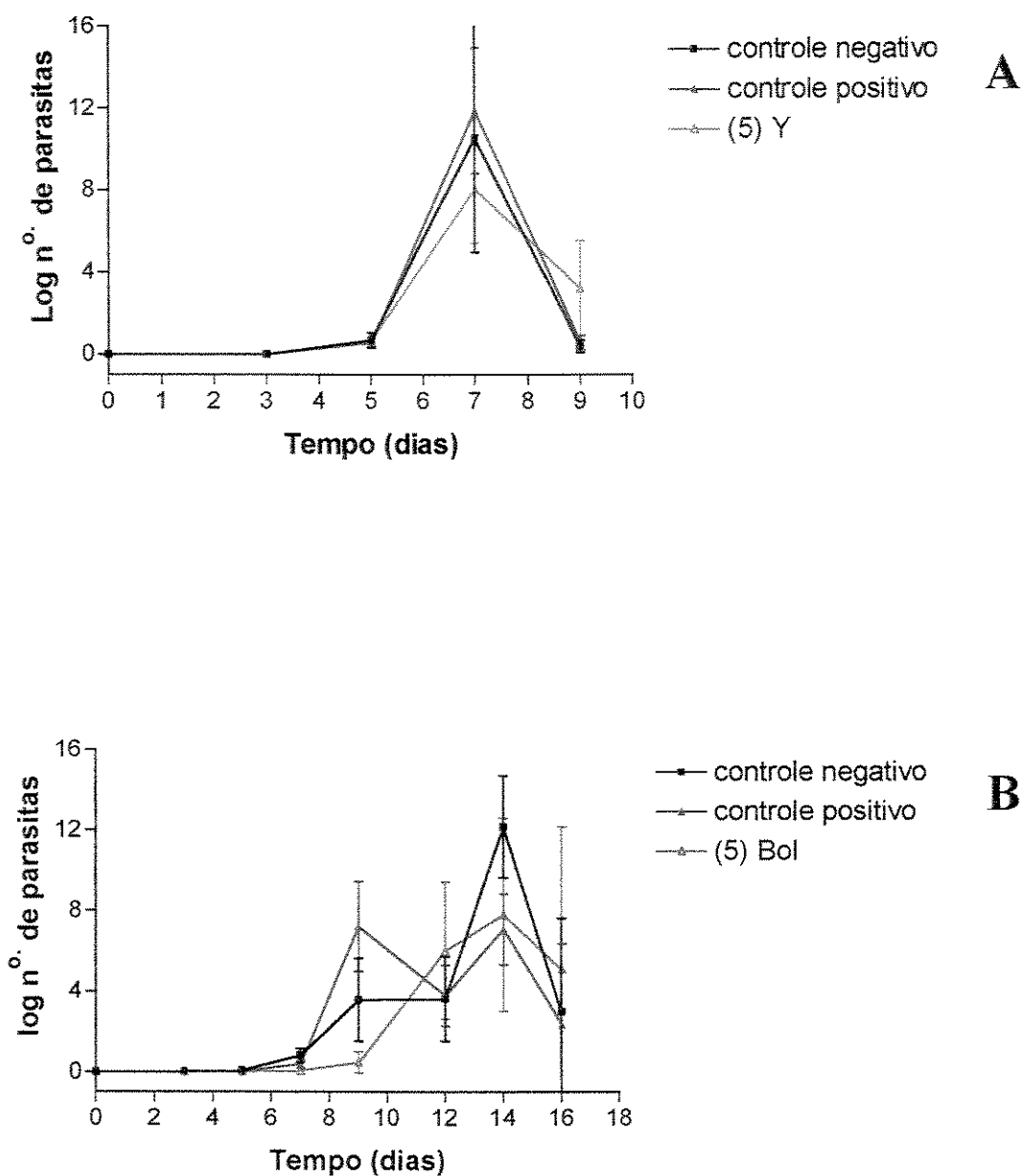


Figura 7. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-(4-benzenosulfonilguanidil)amino metilftalimida (5), na dosagem de 8 mg/kg.

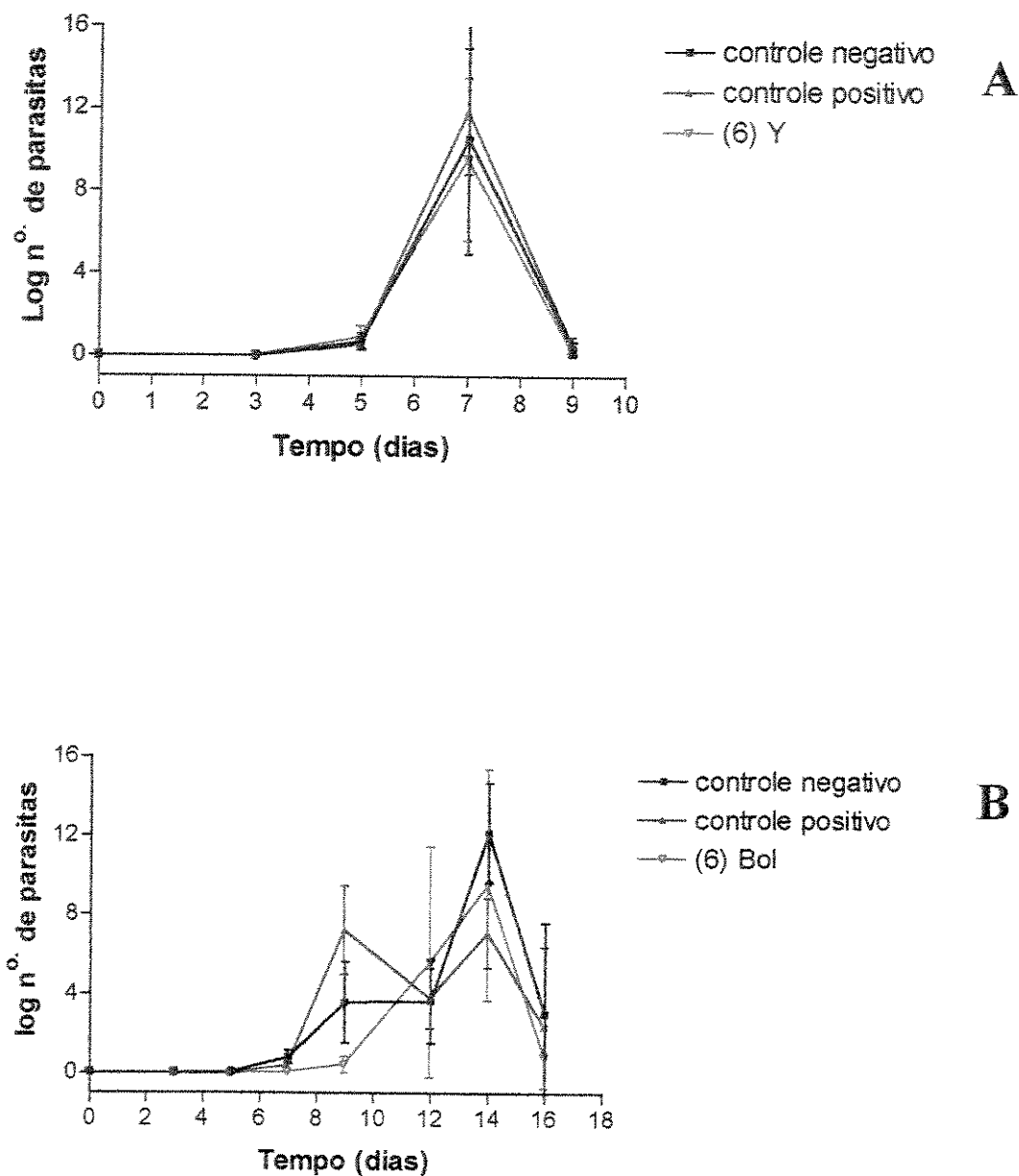


Figura 8. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil)amino] aminometilftalimida (6), na dosagem de 8 mg/kg.

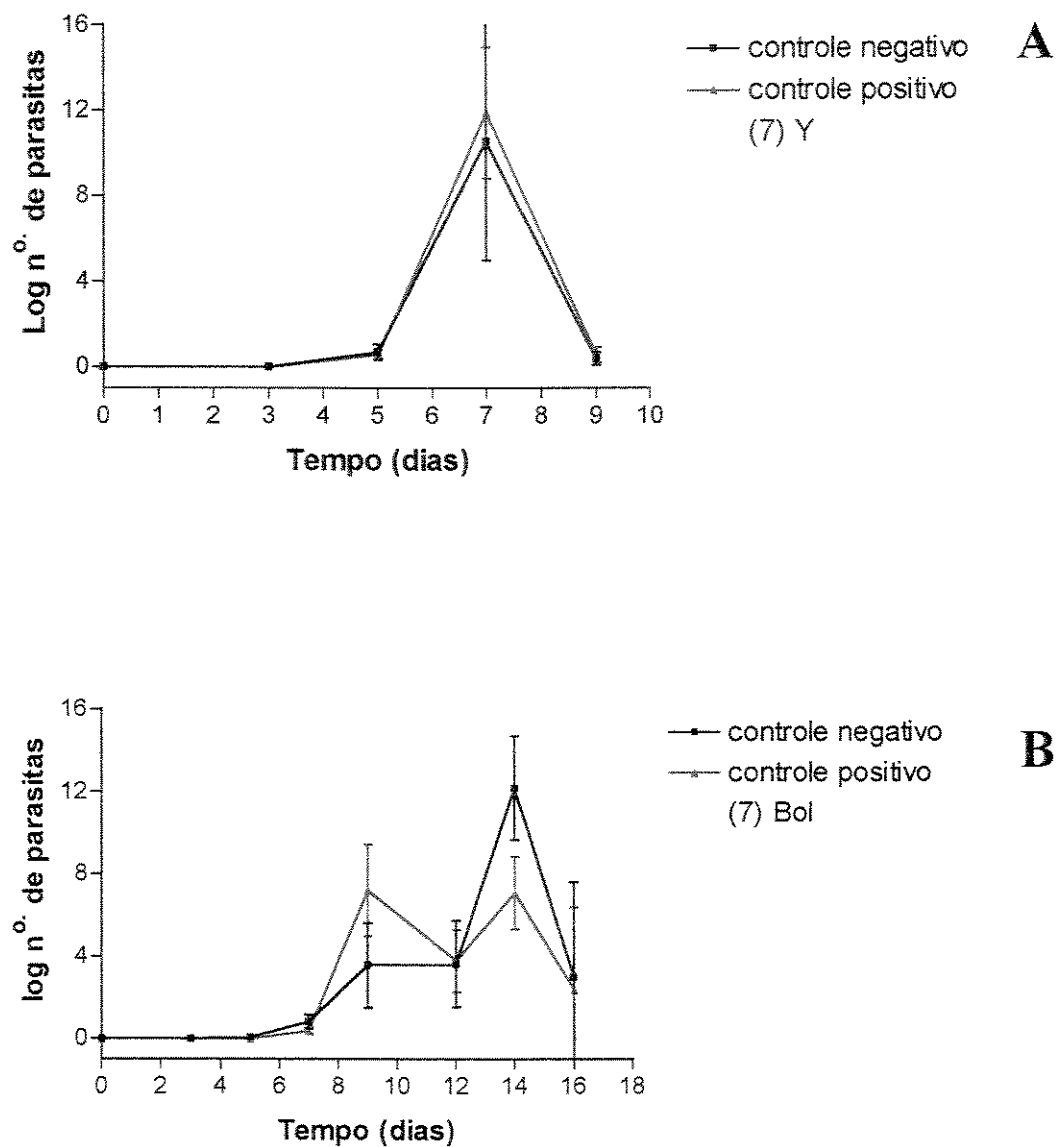


Figura 9. Variação da Parasitemia durante o curso da infecção experimental, em *Mus musculus* infectados intraperitonealmente com 2×10^4 tripomastigotas/mL, das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *Trypanosoma cruzi*. Submetidos ao tratamento diário com a substância N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino] aminometilftalimida (7), na dosagem de 8 mg/kg.

Através dos resultados apresentados nas Figuras 3 a 9, observa-se que a substância (7) apresentou redução significativa de parasitemia nos animais infectados com a cepa Y, quando comparada com os subgrupos controles negativo e positivo.

As substâncias (5) e (6), determinaram ligeira redução dos níveis parasitêmicos nos subgrupos controles negativo e positivo da cepa Y. As demais substâncias não determinaram redução da parasitemia, mantendo níveis semelhantes aos encontrados nos subgrupos controles negativo e positivo.

Em relação à cepa Bolívia, as substâncias (1), (2) e (3) promoveram uma redução significativa dos níveis parasitêmicos, quando comparada com os subgrupos controles negativo e positivo. As demais substâncias determinaram apenas uma pequena redução da curva parasitêmica em relação aos subgrupos controles negativo e positivo.

Através do estudo do comportamento da curva de infecção dos camundongos infectados e tratados, observou-se que o índice de infectividade foi de 100%, para ambas as cepas. A cepa Y apresentou período pré-patente de 3 dias com pico de parasitemia no 7º. dia após o inóculo, enquanto na cepa Bolívia o período pré-patente foi de 5 dias, com pico de parasitemia no 14º. dia.

Em relação à mortalidade dos animais infectados, foi calculada a porcentagem daqueles que morreram espontaneamente durante o curso da infecção, excluindo os que foram sacrificados no dia do pico parasitêmico. Os resultados obtidos estão nas Figuras (10 e 11). Através destas figuras, observou-se que os animais infectados com a cepa Y e tratados com os derivados da ftalimida, não demonstraram diferenças em relação a mortalidade. Já para a cepa Bolívia, os animais que receberam o tratamento tiveram menor

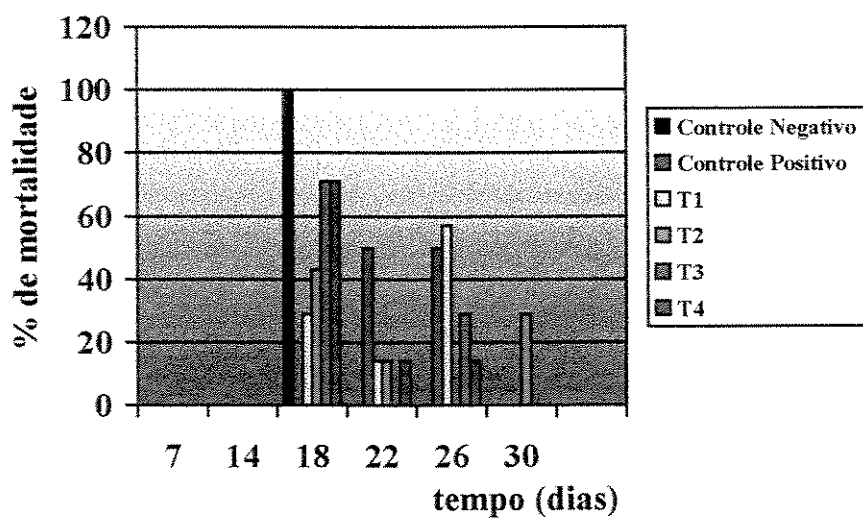
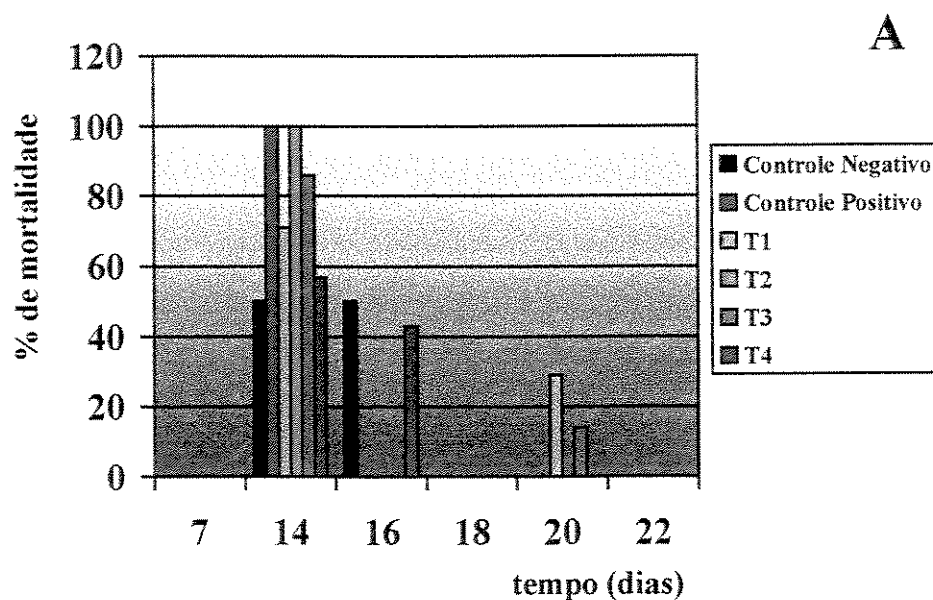


Figura 10. Porcentagem de mortalidade avaliada durante a evolução da infecção experimental em *Mus musculus* infectados com 2×10^4 tripomastigotas sanguíneas das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *T. cruzi*, tratados com os derivados da N-aminometilftalimida.

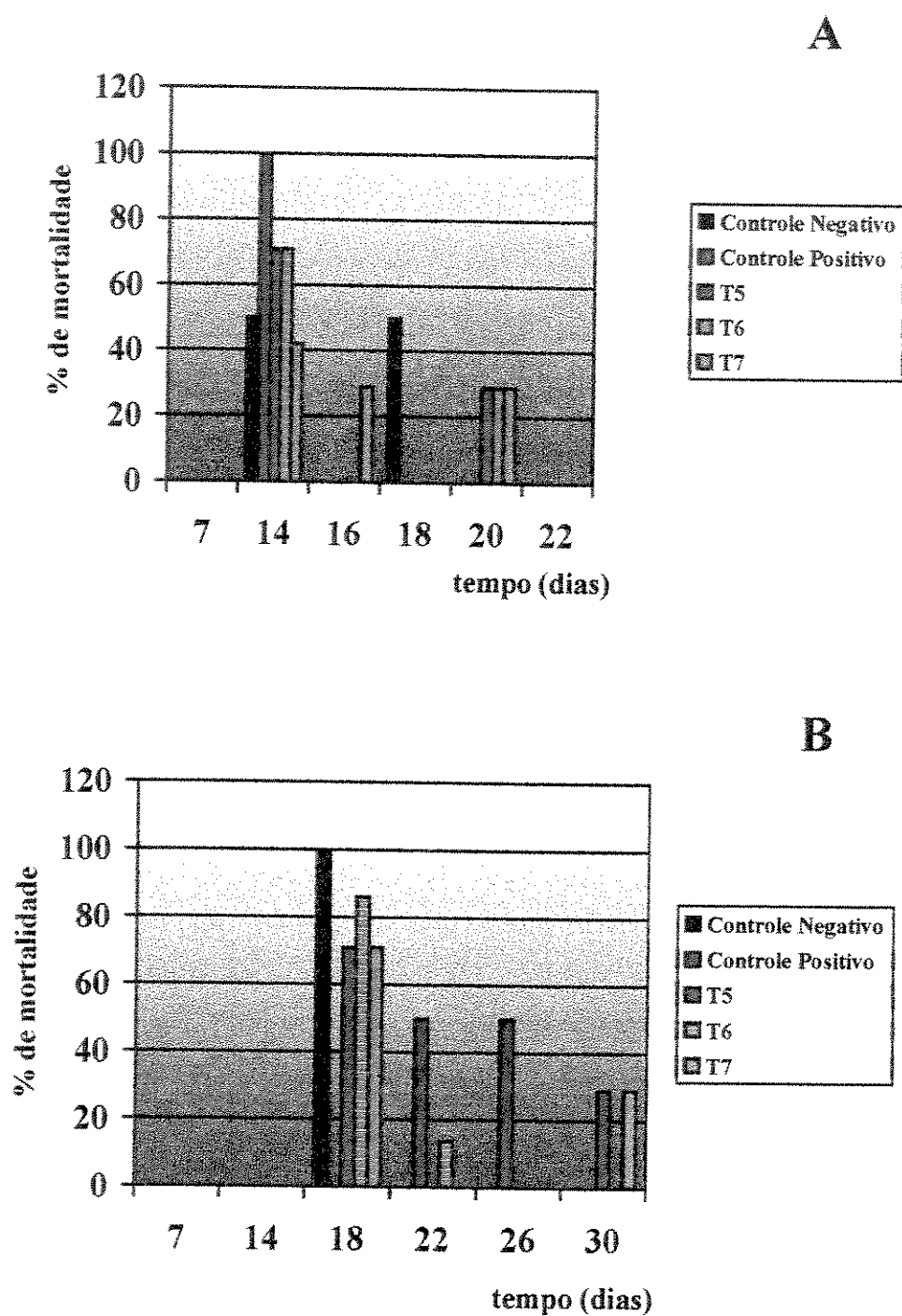


Figura 11. Porcentagem de mortalidade avaliada durante a evolução da infecção experimental em *Mus musculus* infectados com 2×10^4 tripomastigotas sanguíneas das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *T. cruzi*, tratados com os derivados da N-aminometiltalimida.

Nenhuma das substâncias avaliadas determinou cura parasitológica dos animais submetidos a tratamento. Os resultados apresentados até o momento demonstram não existir uma relação clara entre as estruturas das substâncias avaliadas e a atividade sobre o parasito.

A suscetibilidade da cepa a determinado quimioterápico, varia de acordo com a população do parasita. Muitas vezes a ineficácia de um medicamento decorre da possibilidade de os indivíduos não curados serem portadores de cepas resistentes ao tratamento.

5.4.3. Estudo Histopatológico

Pela avaliação histopatológica, verificou-se que mesmo naqueles subgrupos de animais que demonstraram resultados satisfatórios em termos de redução do nível parasitêmico, não foi observada diminuição na incidência de ninhos de amastigotas nos tecidos analisados. Todos os subgrupos apresentaram parasitismo tecidual de forma semelhante ao subgrupo controle negativo, conforme observado nos dados contidos na Tabela 3.

Tabela 3. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual no Coração, Fígado e Baço de *Mus musculus* infectados com 2×10^4 tripomastigotas sanguíneas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*.

Substância/ Cepa	n°. animais	Dias de infecção	Órgãos		
			Coração (%)	Fígado (%)	Baço (%)
Cepa Y					
CN*	3	7	+	++	+++
CP**	3	7	+++	-	++
(1)	3	7	+	-	+++
(2)	3	7	++	+	-
(3)	3	7	-	-	-
(4)	3	7	+	+	+
(5)	3	7	++	+	-
(6)	3	7	+++	++	+
(7)	3	7	-	+	-
Cepa Bolívia					
CN*	3	14	++	+	-
CP**	3	14	+	+	-
(1)	3	14	+	+	-
(2)	3	14	+++	-	-
(3)	3	14	+	-	-
(4)	3	14	+	-	-
(5)	3	14	+++	+	-
(6)	3	14	++	-	-
(7)	3	14	++++	-	-

CN* - Controle Negativo;

CP** - Controle Positivo.

5.4.3.1.Cepa Y

Por meio da análise histopatológica das fibras cardíacas, verificou-se que os subgrupos submetidos ao tratamento diário com benzonidazol e substância (6), apresentaram intensidade de parasitismo (+++; 25% a 50%) maior que as demais substâncias, incluindo o subgrupo controle negativo.

Na maioria dos subgrupos, a musculatura cardíaca estava constituída de fibras mais dispersas e os núcleos apresentaram alterações morfométricas significativas.

Analisando a Tabela (3), verifica-se que o fígado apresentou parasitismo moderado (++; 25% a 12,5%) nos subgrupos controle negativo e tratado com a substância (6). Para os demais subgrupos, a presença de ninhos com formas amastigotas foi baixa (+; < 12,5%) ou ausente.

Microscopicamente, o fígado de todos os subgrupos demonstrou hepatócitos vacuolizados, com núcleos bem evidentes, da mesma forma que as veias centrolobulares. Os sinusóides apresentaram-se mais dilatados com algumas áreas apresentando nítida desorganização tecidual.

Os animais pertencentes ao controle negativo e ao subgrupo tratado com a substância (1), apresentaram maior intensidade de ninhos de amastigotas (+++; 25% a 50%) nas células esplênicas, enquanto o controle positivo tratado com benzonidazol, apresentou (++; 12,5% à 25%) de positividade.

Para os demais subgrupos, a intensidade do parasitismo foi reduzida (+; < 12,5%) ou ausente (-).

De modo geral, os animais infectados com a cepa Y apresentaram parasitismo tecidual acentuado. Este fato está relacionado entre outros, com a morfologia desta cepa, predominantemente constituída de formas delgadas, possuírem maior capacidade de interiorização nos tecidos (CASTRO et al., 1985).

De acordo com a classificação feita por MILES et al. (1980) como *T. cruzi* II, indica que esta cepa é mais virulenta em infecções humanas, podendo determinar manifestações graves na doença de Chagas (MILES et al., 1980; ZINGALES, 2000).

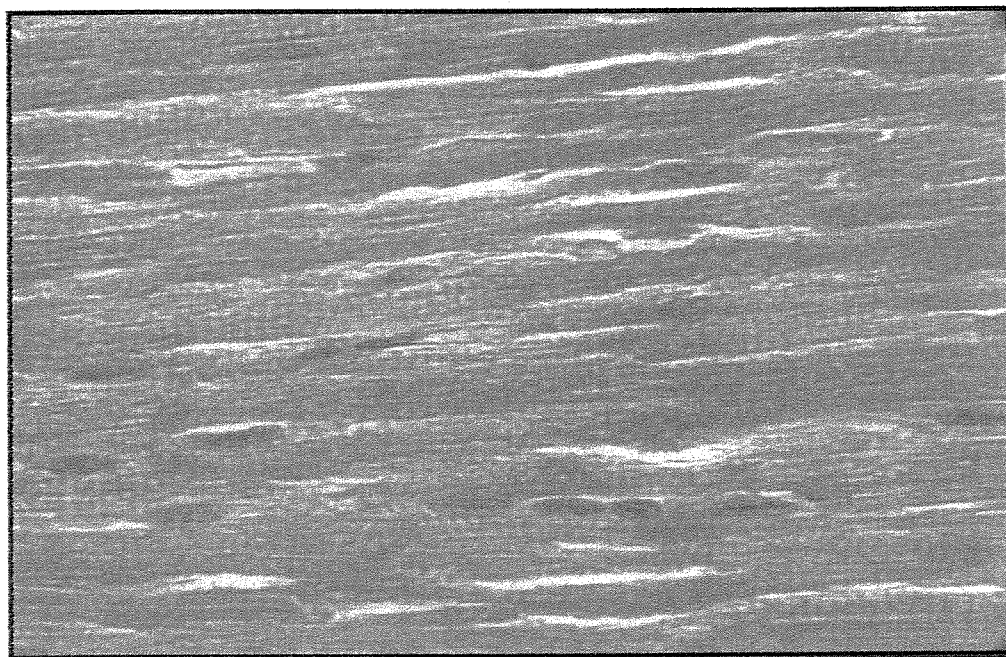


Figura 12. Coração de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

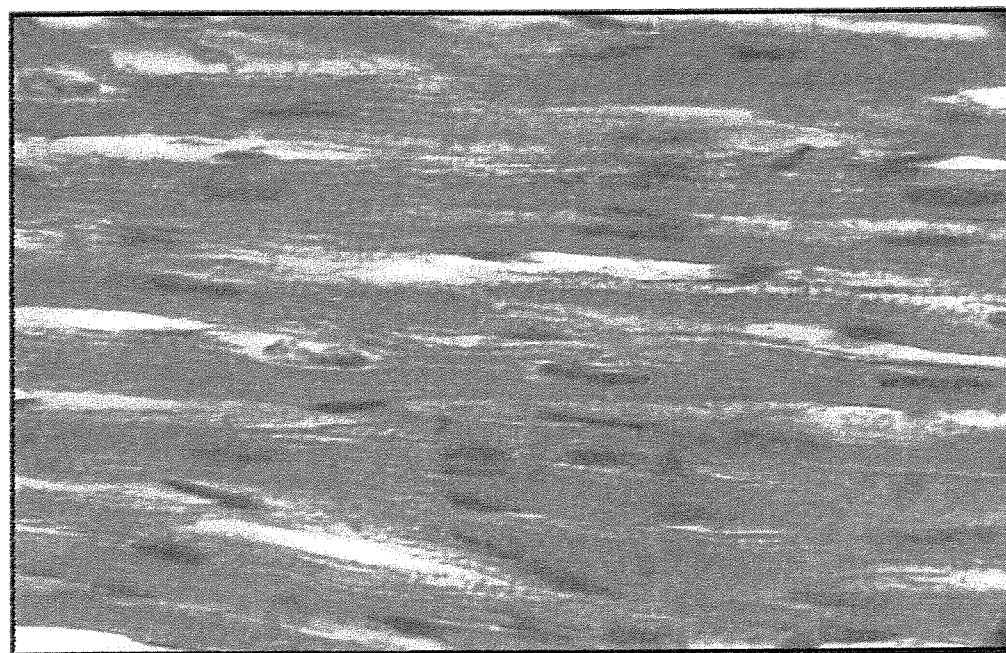


Figura 13. Coração de *Mus musculus* do controle negativo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitário. HE (x1000).



Figura 14. Coração de *Mus musculus* do controle positivo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com benzonidazol. Presença de ninho de amastigotas nas fibras cardíacas. HE (x1000).

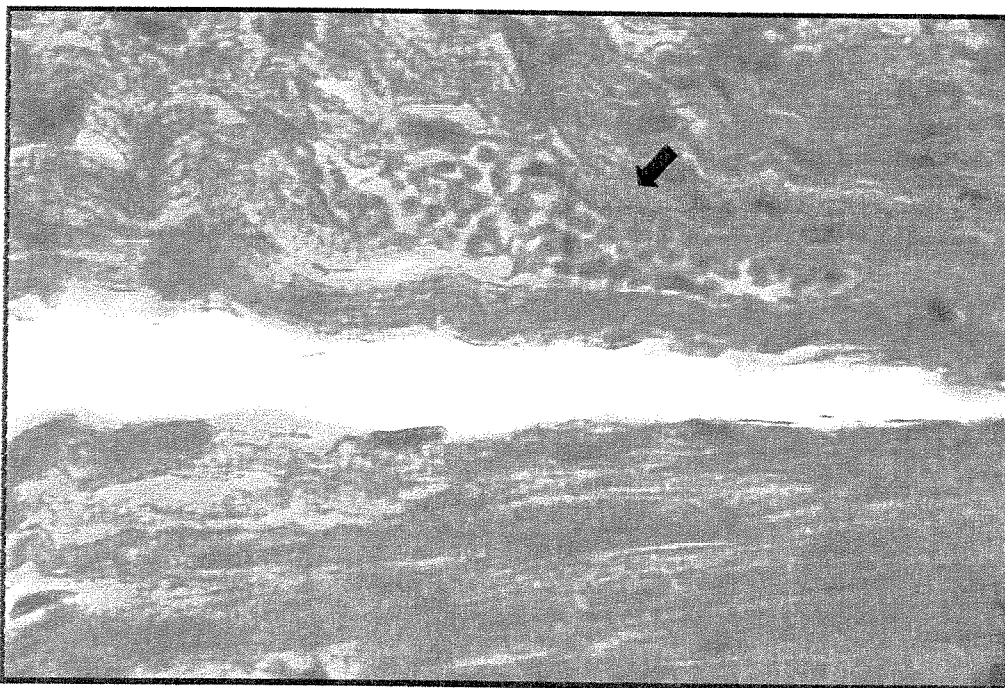


Figura 15. Coração de *Mus musculus* do subgrupo infectado com 2×10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com a substância (6). Presença de ninho de amastigotas nas fibras cardíacas e desorganização tecidual. HE (x1000).

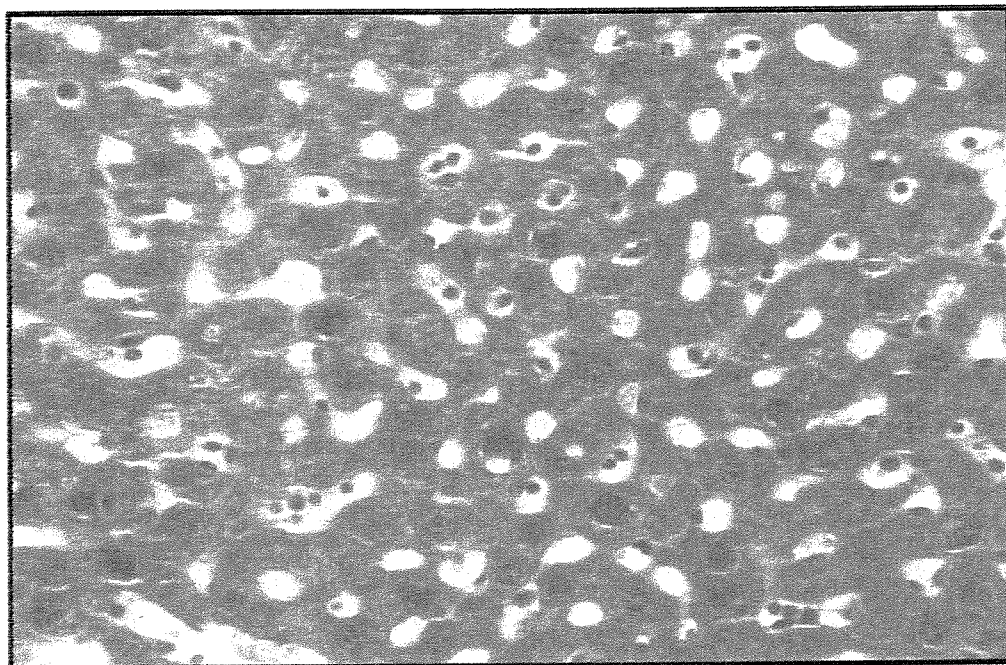


Figura 16. Fígado de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

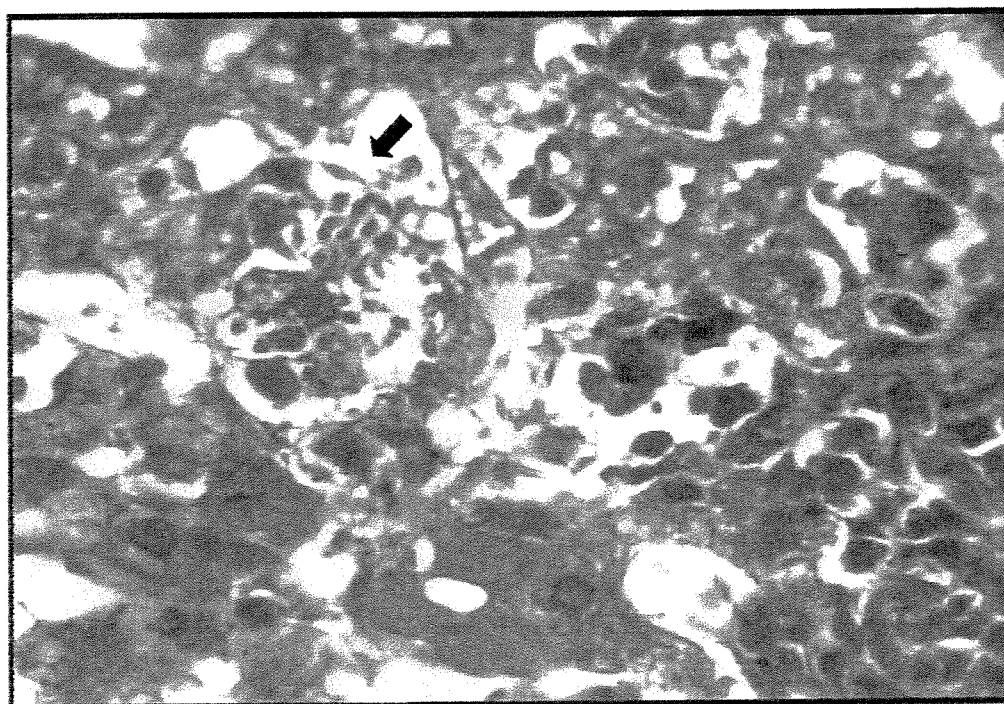


Figura 17. Fígado de *Mus musculus* do controle negativo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico. Presença de ninho de amastigotas, a destruição tecidual, alteração dos sinusóides e processo inflamatório. HE (x1000).

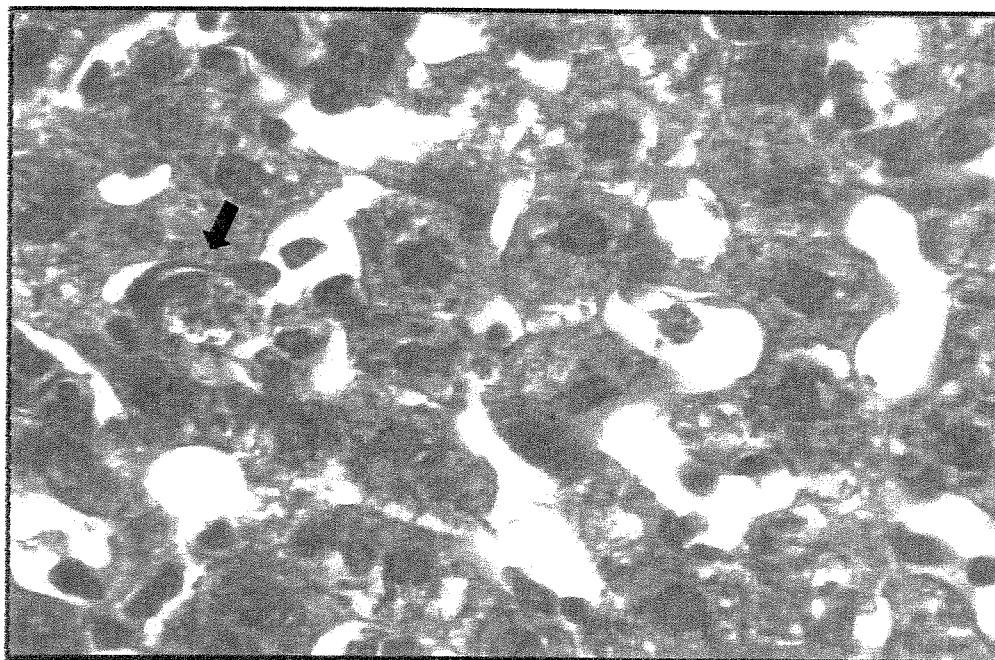


Figura 18. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com a substância (6). Presença de ninho de amastigotas, hepatócitos com citoplasma vacuolizado e sinusóides dilatados. HE (x1000).

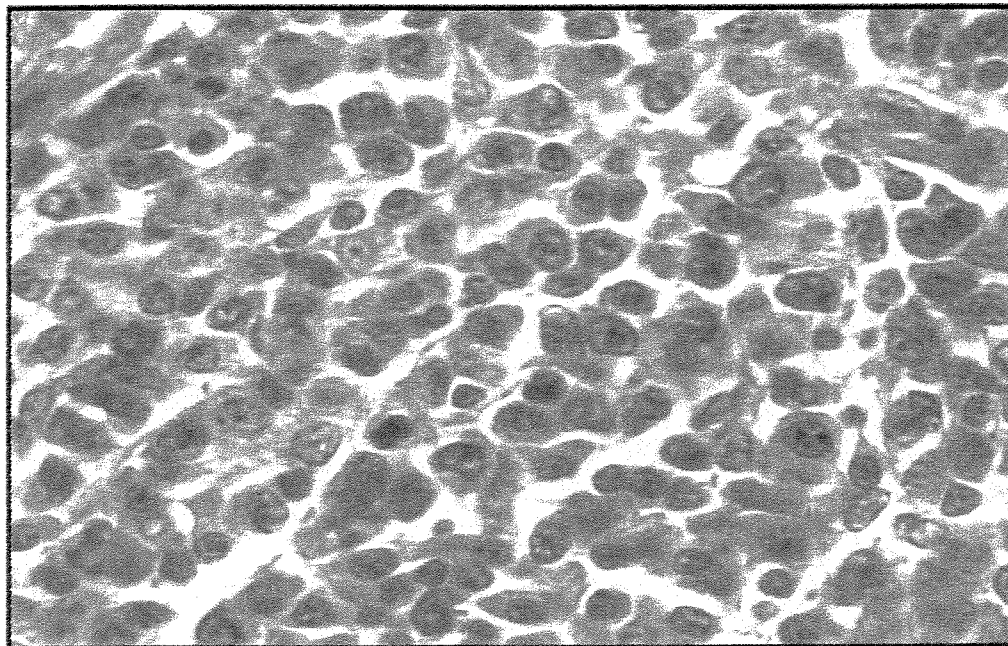


Figura 19. Baço de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

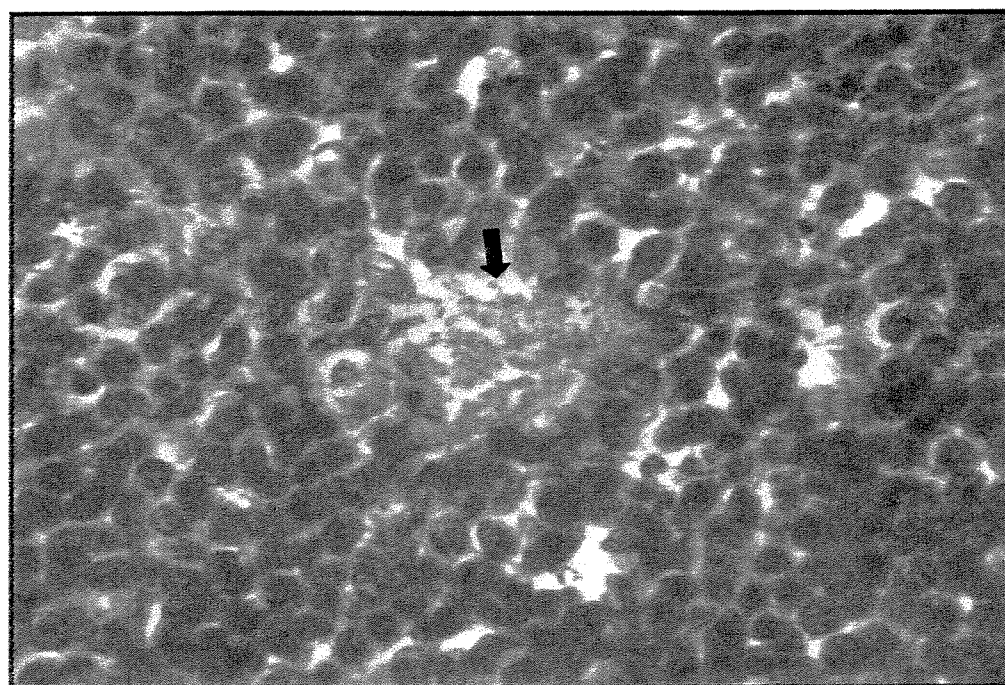


Figura 20. Baço de *Mus musculus* do controle negativo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico. Presença de ninho de amastigotas. HE (x1000).

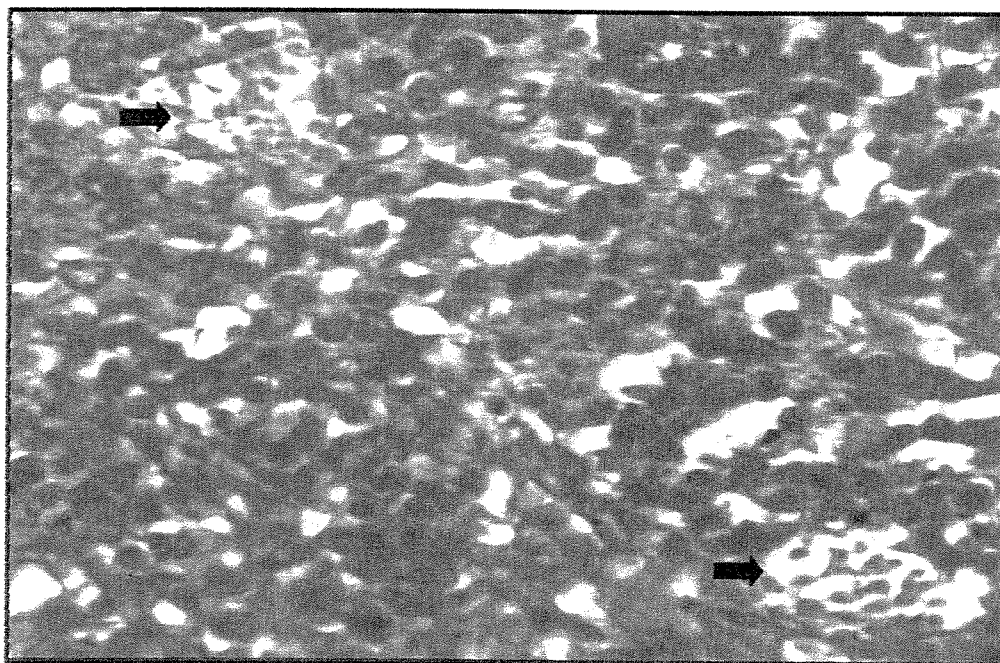


Figura 21. Baço de *Mus musculus* do controle positivo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com benzonidazol. Presença de ninhos de amastigotas. HE (x1000).

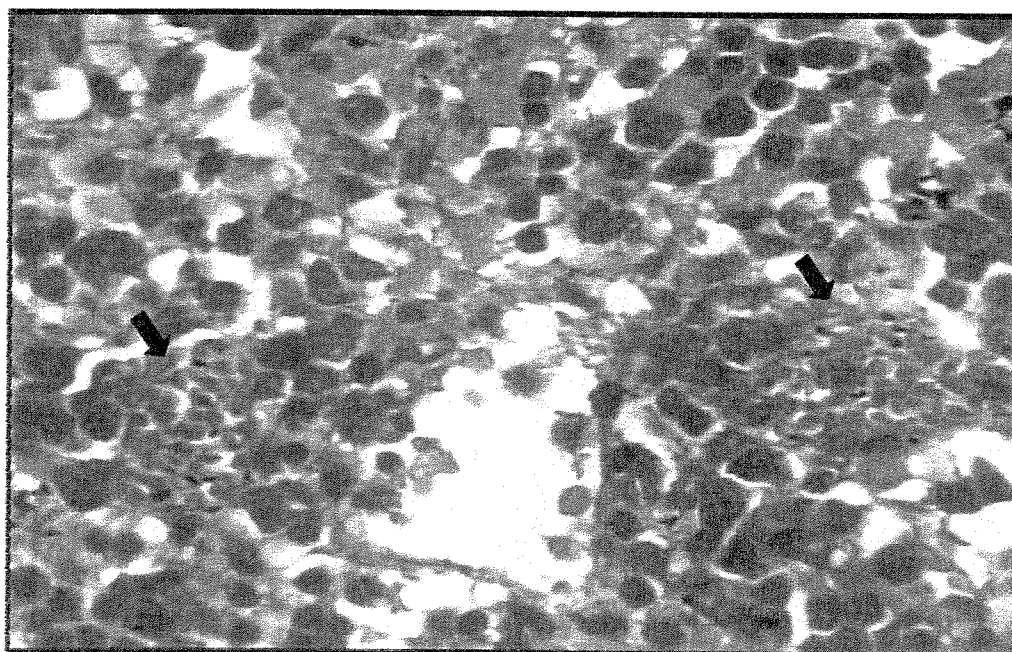


Figura 22. Baço de *Mus musculus* do subgrupo infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Y de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com a substância (1). Presença de ninhos de amastigotas e desorganização tecidual. HE (x1000).

5.4.3.2.Cepa Bolívia

De acordo com a Tabela 3, as fibras cardíacas dos animais infectados com a cepa Bolívia, apresentaram maior quantidade de ninhos de amastigotas, quando comparados com os dados obtidos para a cepa Y.

O subgrupo tratado com a substância (7) apresentou maior intensidade do parasitismo nas fibras cardíacas (++++; > 50%), assim como as substâncias (2) e (5) apresentaram de 25% a 50% dos campos examinados parasitados. Sendo assim, o parasitismo nestes subgrupos foi maior quando comparados ao controle negativo (++; 25% a 50%). As demais substâncias demonstraram um parasitismo reduzido (+; < 12,5%).

Em alguns subgrupos, principalmente aqueles cujo parasitismo foi maior, observou-se espaços intersticiais alterados, fibras cardíacas desorganizadas e destruídas, com núcleos significativamente atrofiados.

Os hepatócitos demonstraram parasitismo reduzido quando comparados com a cepa Y. Isso provavelmente ocorre, em função do grau de virulência e tropismo tecidual da cepa. A maioria dos subgrupos apresentou baixa intensidade do parasitismo, variando de (+; < 12,5%) para o controle negativo, até a ausência completa de parasitas para alguns subgrupos (-).

Os lóbulos hepáticos, apresentaram-se microscopicamente alterados e vacuolizados com sinusóides mais dilatados quando comparados aos camundongos não infectados. Alterações nucleares foram visualizadas e verificadas através da análise morfométrica.

Nesta cepa, para todos os subgrupos experimentais, o parasitismo esplênico foi negativo (-).

Histologicamente, os esplenócitos apresentaram hipertrofia nuclear e desarranjo celular na maioria dos subgrupos.

RIBEIRO et al. (1988b), estudando as características desta cepa, usando camundongos Swiss, observaram a capacidade de invasão em todos os tipos de células. No presente trabalho, a análise histológica revelou parasitismo predominante para as fibras cardíacas, seguido do fígado com menor intensidade, demonstrando claramente o tropismo preferencial dessa cepa de *T. cruzi* para a musculatura em geral, e não para células do sistema fagocitário mononuclear.

POSTAN et al. (1987), relatam o fato de que inúmeras cepas de *T. cruzi* podem mudar suas características biológicas no decorrer do tempo, fruto de uma nova adaptação ao organismo do hospedeiro. Consequentemente alterando o tropismo celular, severidade das lesões, sempre na dependência de uma relação de equilíbrio parasita e hospedeiro.

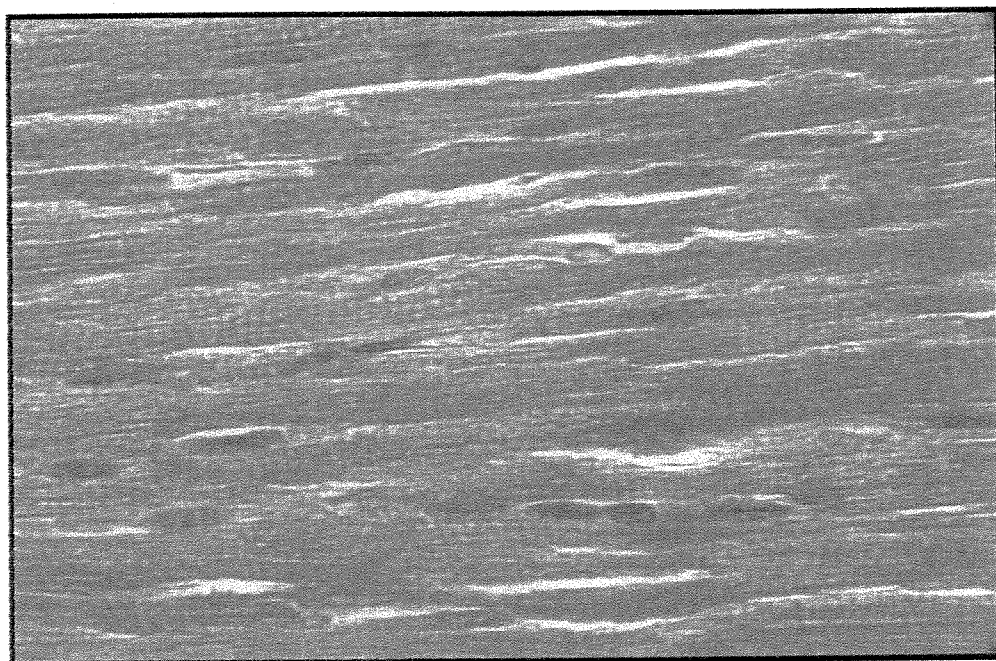


Figura 23. Coração de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

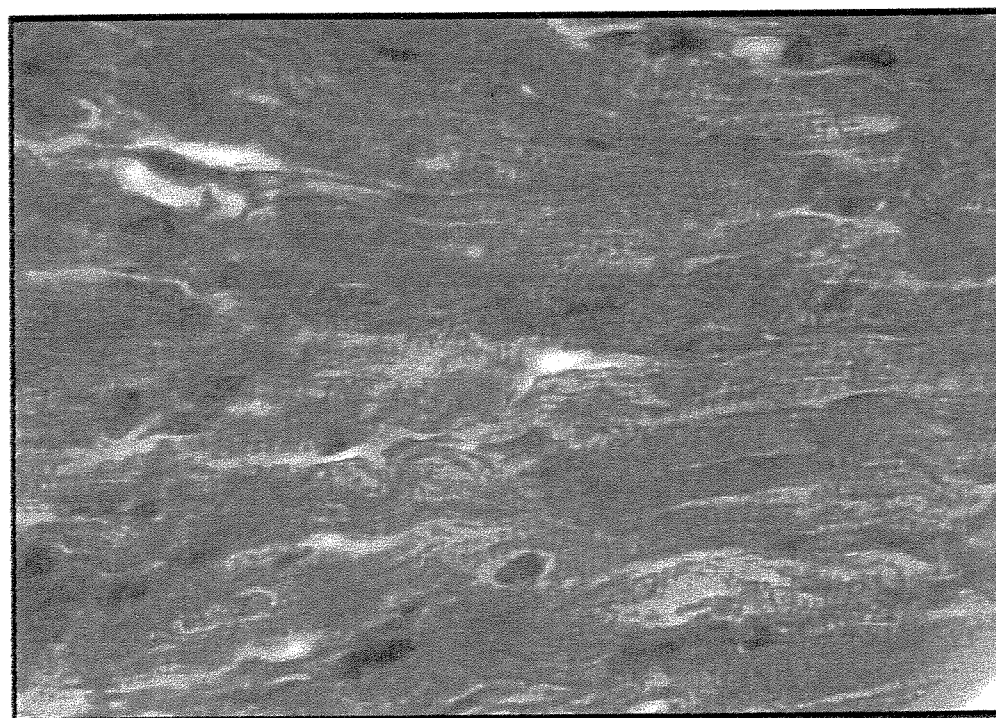


Figura 24. Coração de *Mus musculus* do controle negativo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, colhido no pico parasitémico. Notar a desorganização das fibras cardíacas. HE (x1000).



Figuras 25. Coração de *Mus musculus* do subgrupo infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, colhido no pico parasitário e tratado com as substâncias 2(A) e 5(B). Presença de ninho de amastigotas e o espaço intersticial alterado entre as fibras cardíacas. HE (x1000).

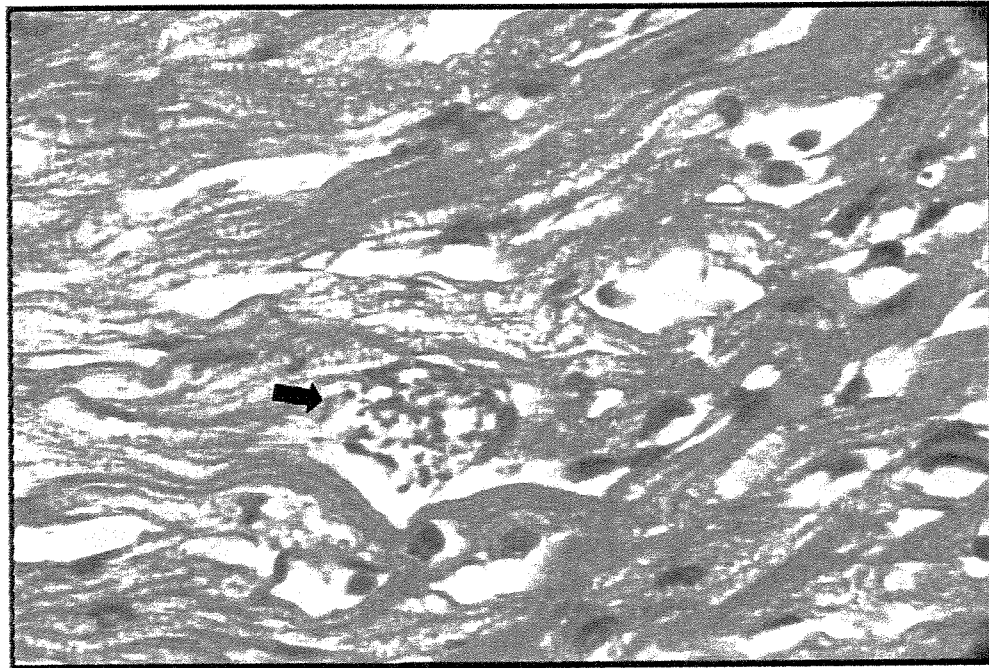


Figura 26. Coração de *Mus musculus* do subgrupo infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com a substância (7). Presença de ninho de amastigotas e desorganização das fibras cardíacas. HE (x1000).

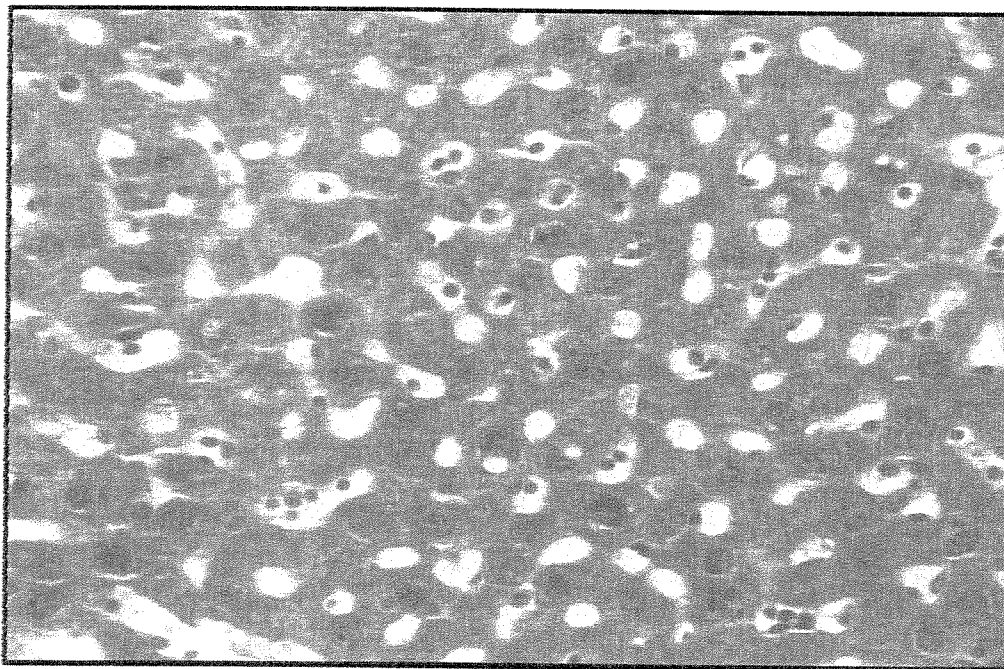


Figura 27. Fígado de *Mus musculus* do controle sem infecção, HE (x1000).

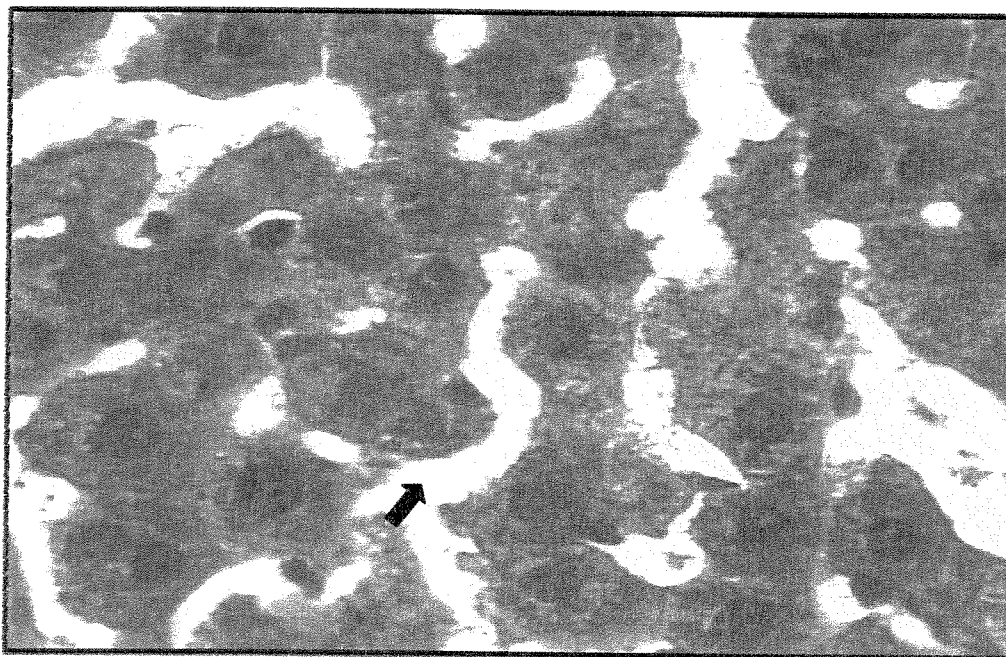


Figura 28. Fígado de *Mus musculus* do controle negativo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico. Notar os sinusóides dilatados. HE (x1000).

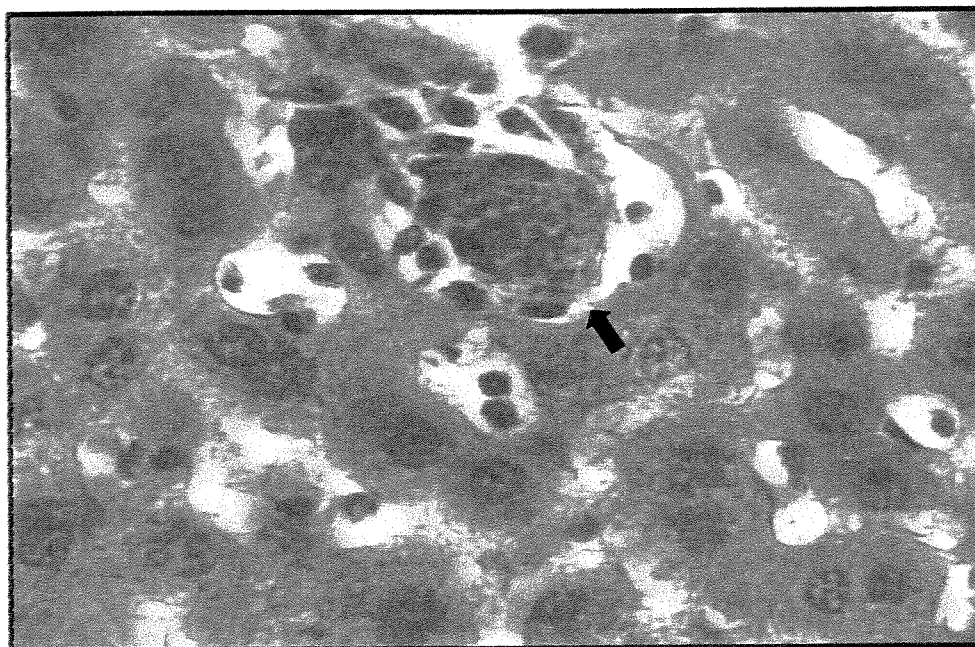


Figura 29. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, colhido no pico parasitêmico e tratado com a substância (5). Presença de ninho de amastigotas, sinusóides alterados e o citoplasma dos hepatócitos vacuolizados. HE (x1000).

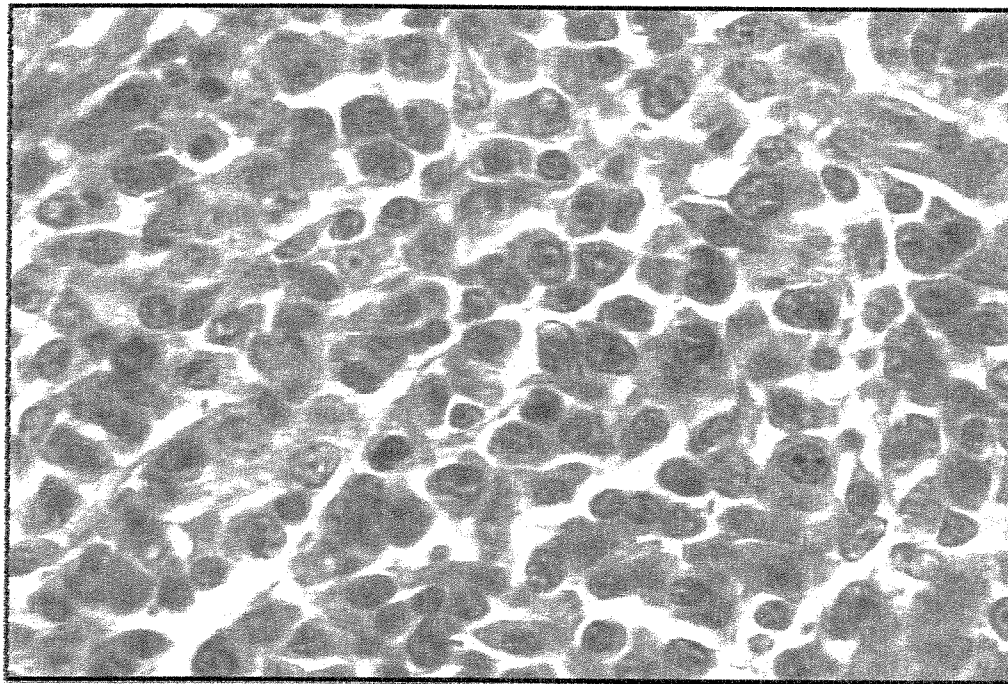


Figura 30. Baço de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

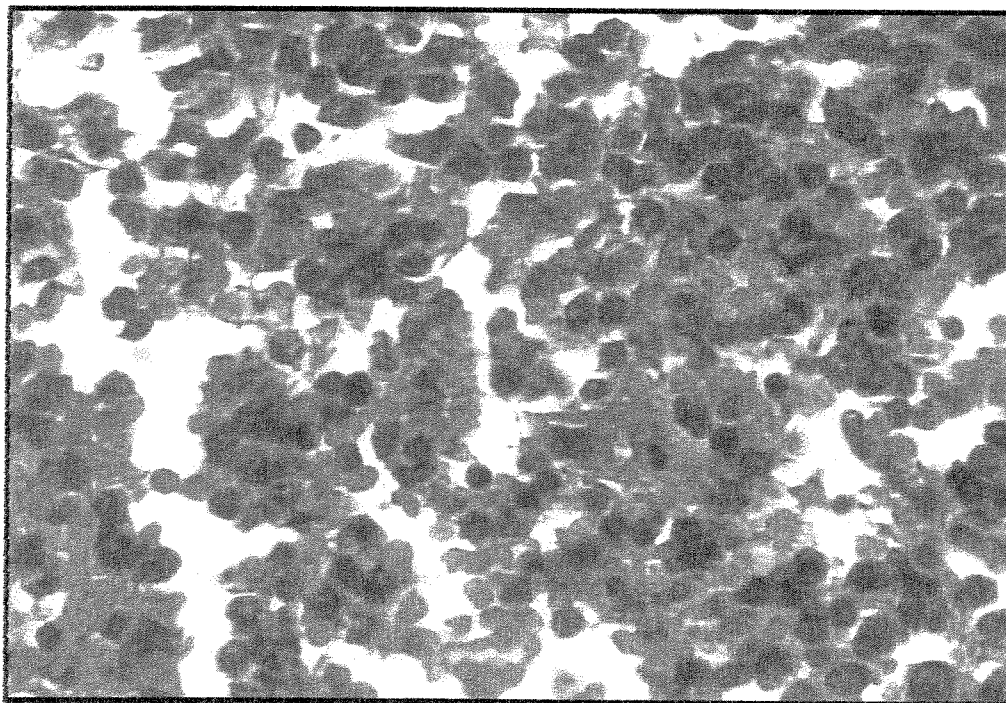


Figura 31. Baço de *Mus musculus* do controle negativo, infectado com 2×10^4 tripomastigotas com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, colhido no pico parasitário. Notar desorganização tecidual. HE (x1000).

5.4.3.3. Análise Toxicológica dos Subgrupos Tratamento Paralelo

Microscopicamente foi possível observar que os órgãos dos camundongos não infectados e submetidos ao tratamento diário (Tratamento Paralelo), apresentaram processo inflamatório moderado quando comparado com os resultados obtidos nos subgrupos infectados e tratados, para ambas as cepas (Figuras 32 a 52).

Em relação aos tratamentos de curto (7 dias) e longo (14 dias) prazos, não foi possível observar alterações qualitativas no aspecto histológico.

Morfometricamente estas substâncias exerceram hipertrofia e atrofia de alguns parâmetros nucleares, sendo alterações estatisticamente significativas.

Portanto, de acordo com esta análise toxicológica, as substâncias exerceram efeito tóxico à nível tecidual.

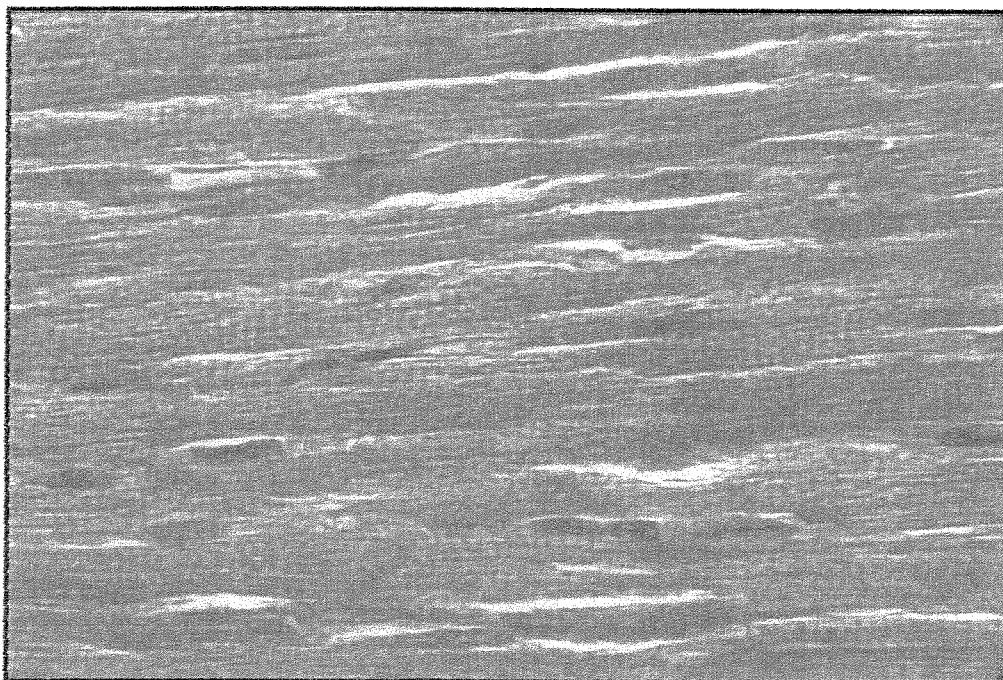


Figura 32. Coração de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

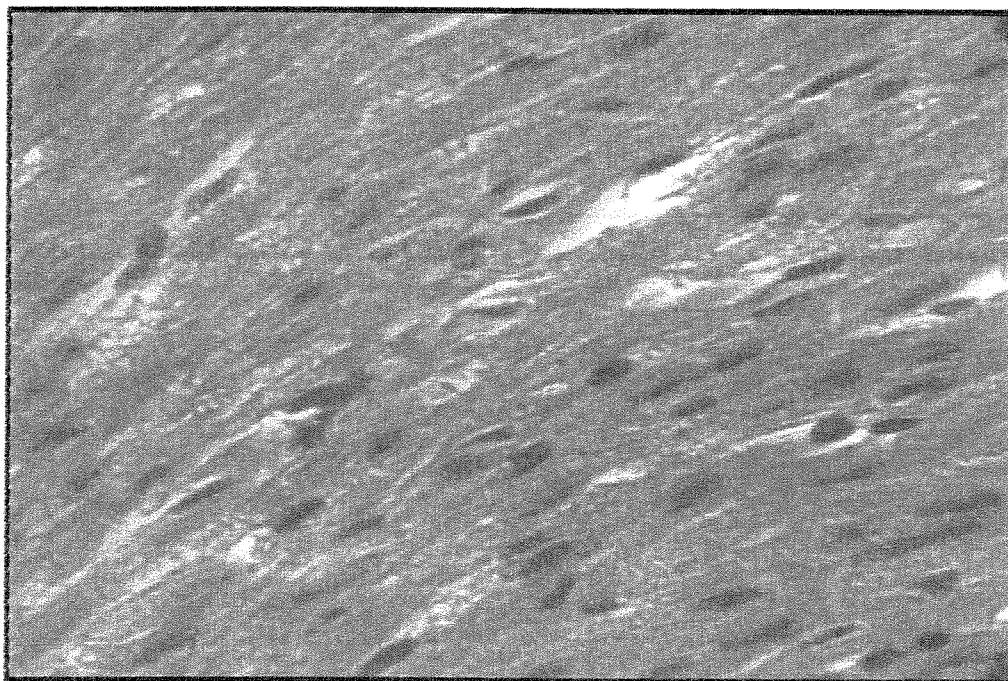


Figura 33. Coração de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (1). Notar o aspecto tecidual semelhante ao subgrupo controle sem infecção. HE (x1000).

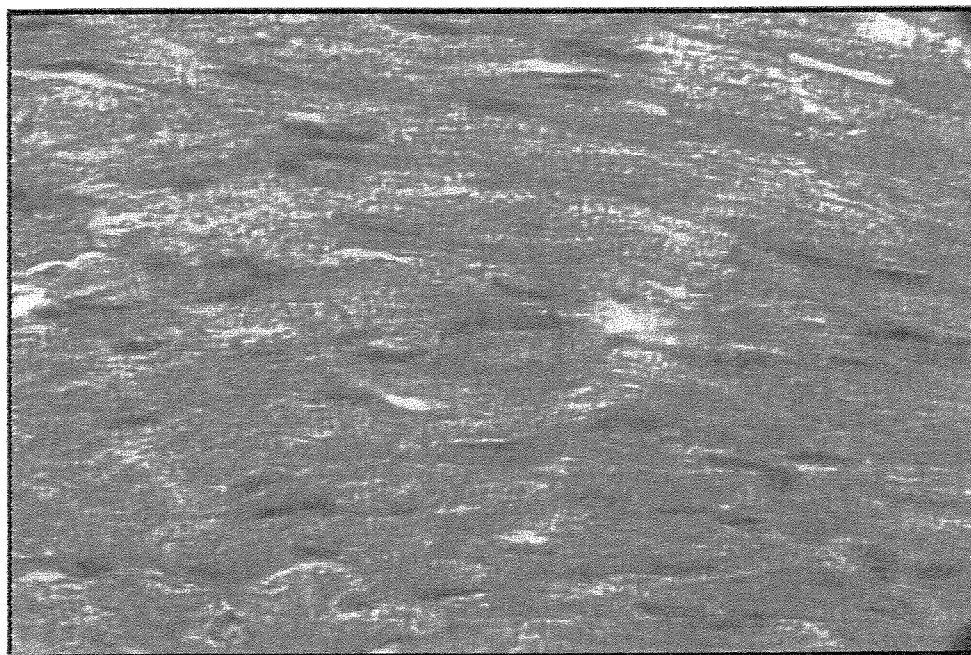


Figura 34. Coração de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (2). Notar o aspecto tecidual semelhante ao subgrupo controle sem infecção. HE (x1000).

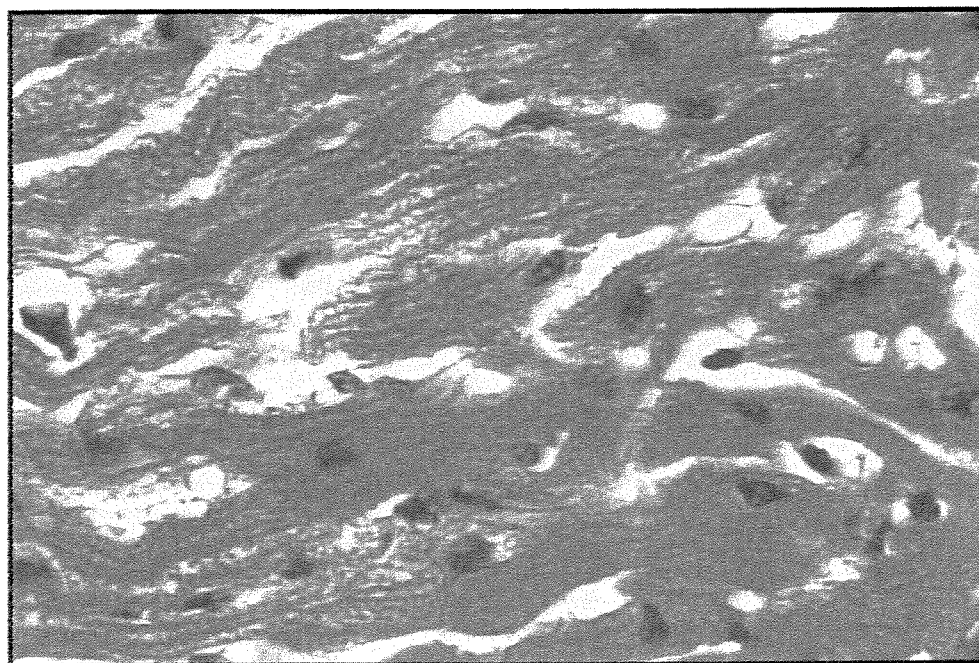


Figura 35. Coração de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (3). Notar desorganização das fibras cardíacas. HE (x1000).

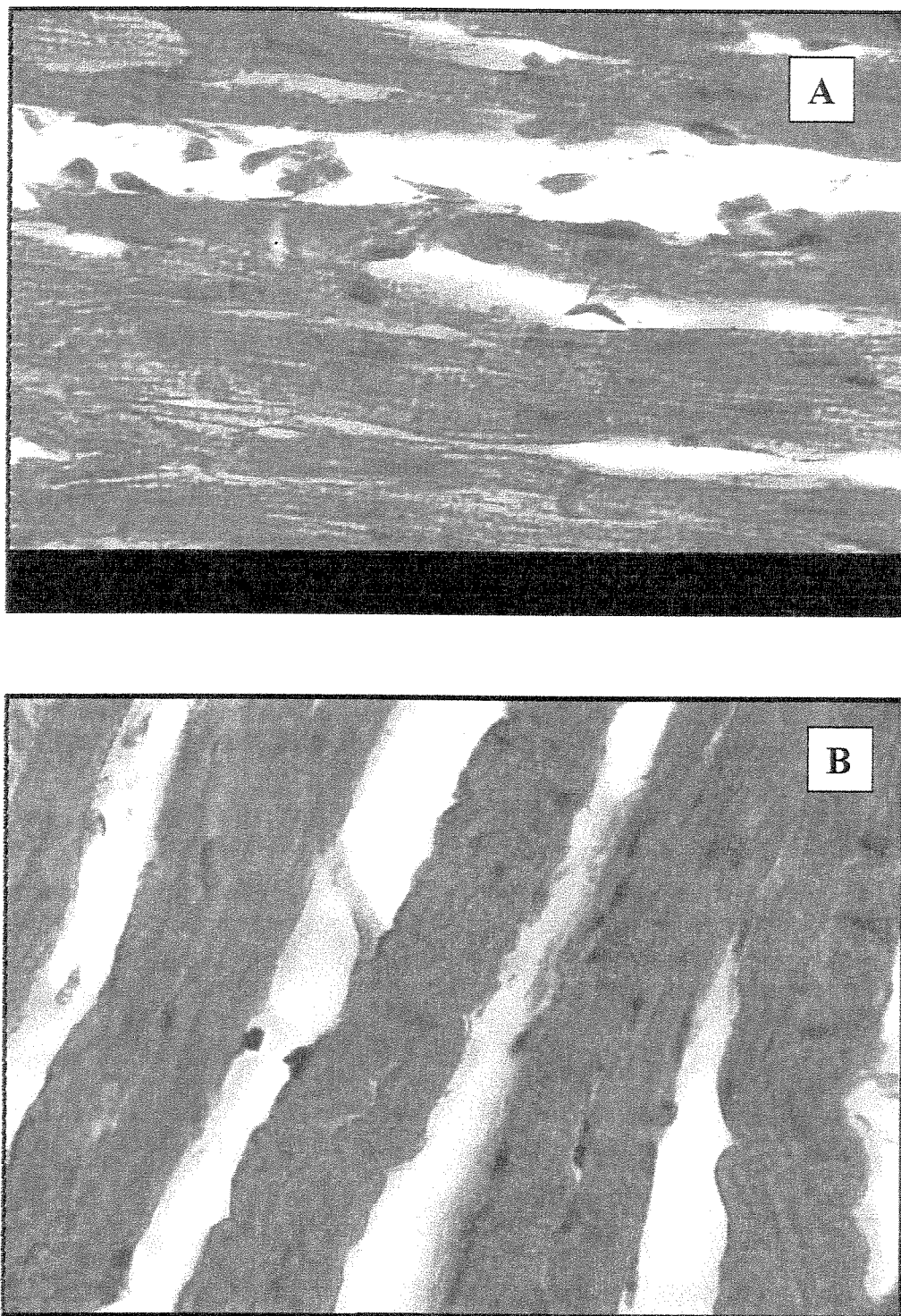


Figura 36. Coração de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância 4 (A) e 5 (B).. Notar a desorganização das fibras cardíacas. HE (x1000).

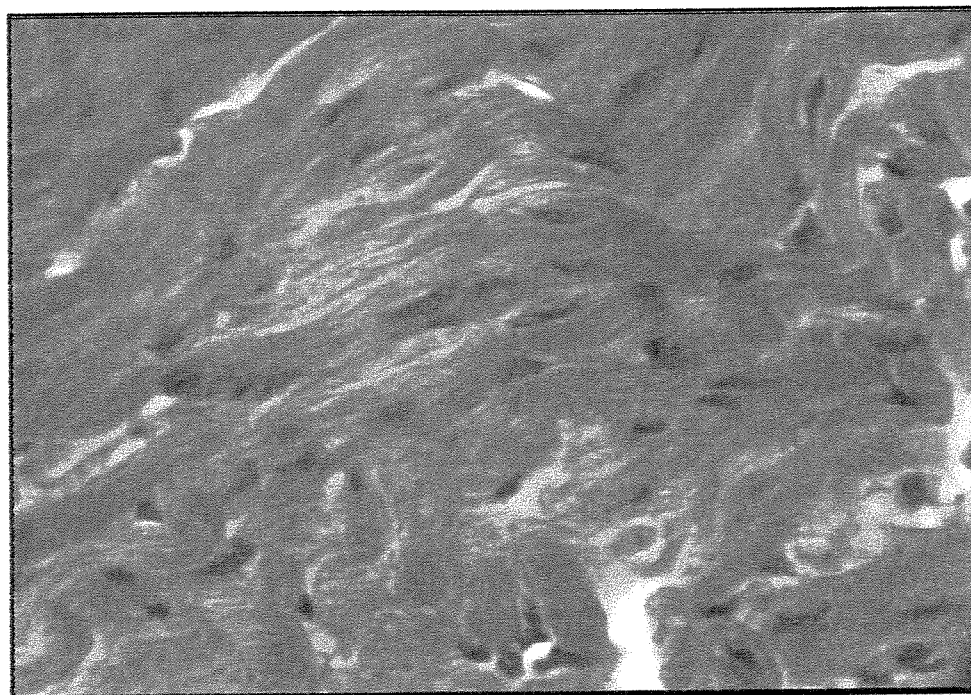


Figura 37. Coração de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (6). Notar a desorganização das fibras cardíacas. HE (x1000).

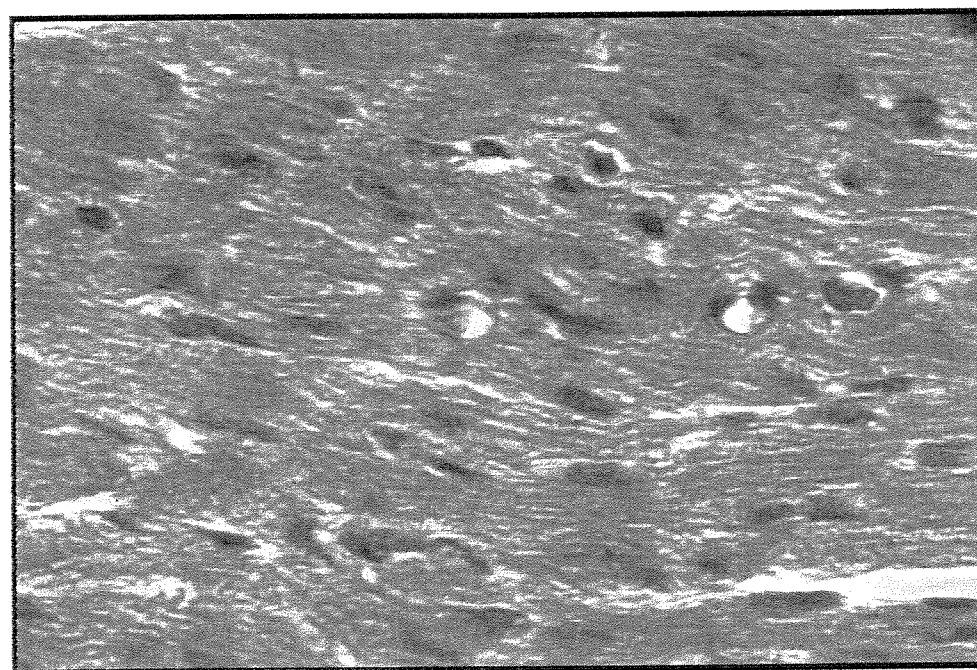


Figura 38. Coração de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (7). Notar o aspecto tecidual semelhante ao subgrupo controle sem infecção. HE (x1000).

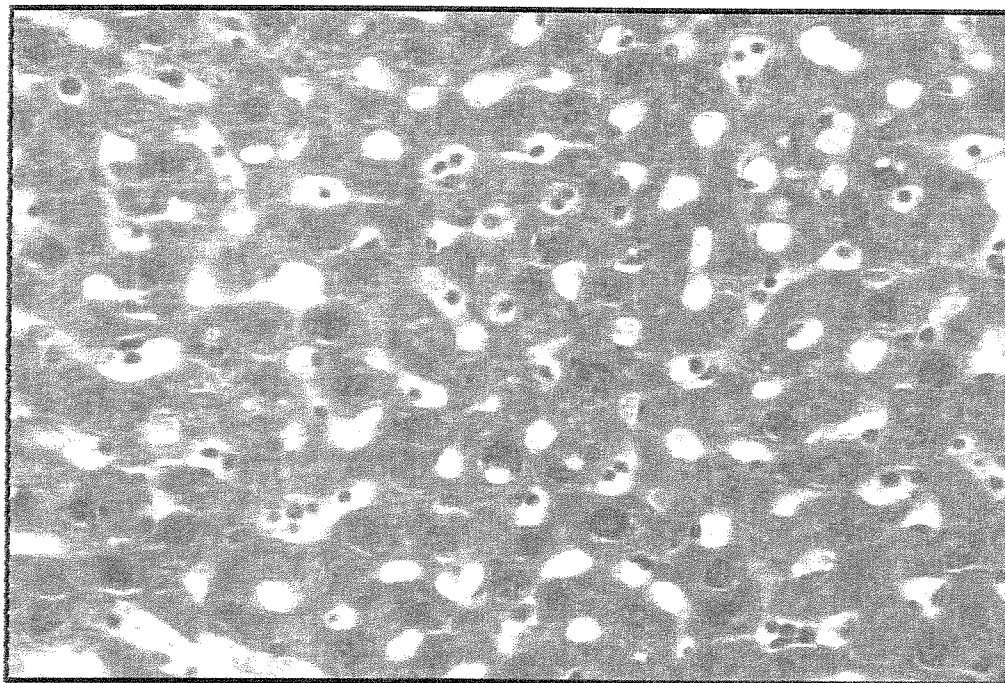


Figura 39. Fígado de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

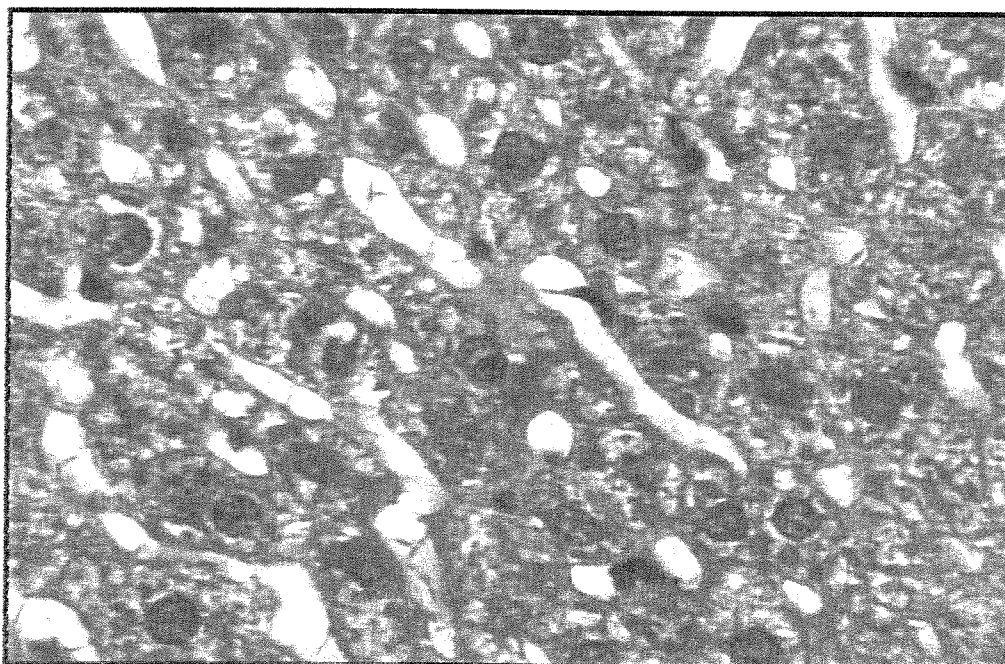


Figura 40. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (1). Notar hepatócitos alterados com citoplasma vacuolizado. HE (100X).

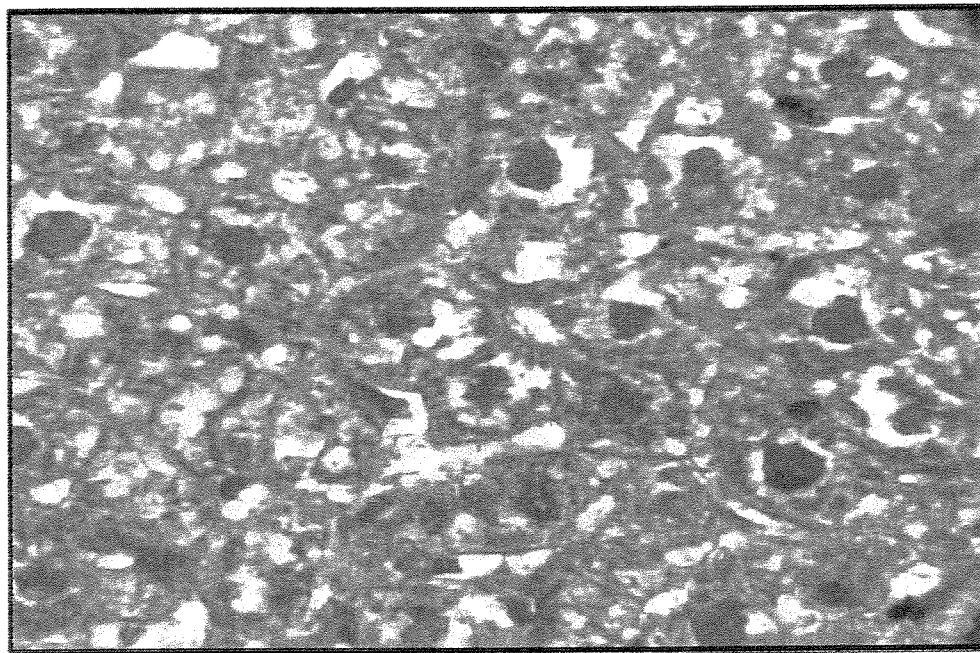


Figura 41. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (2). Notar hepatócitos descaracterizados. HE (x1000).

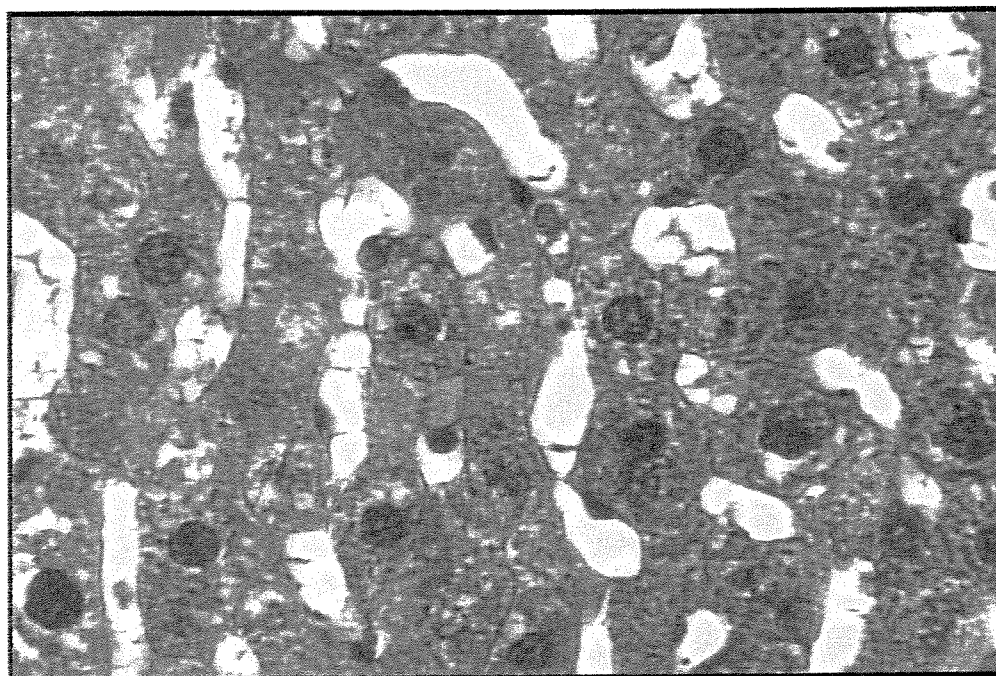


Figura 42. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (3). Notar hepatócitos com citoplasma vacuolizado e sinusóides dilatados. HE (x1000).

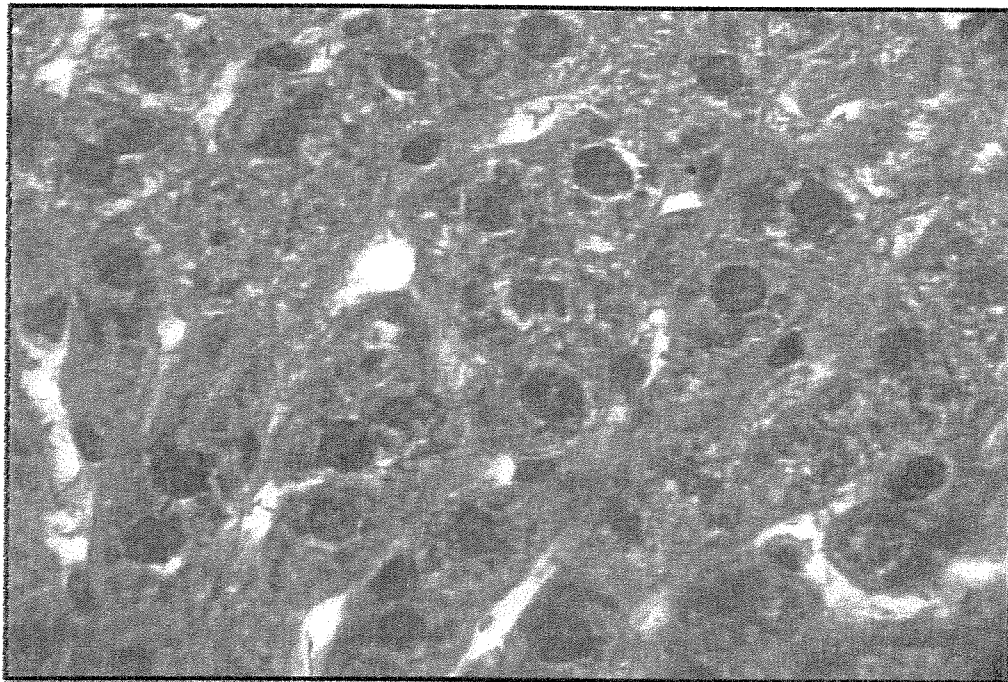


Figura 43. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (4). Notar hepatócitos com citoplasma vacuolizado. HE (x1000).

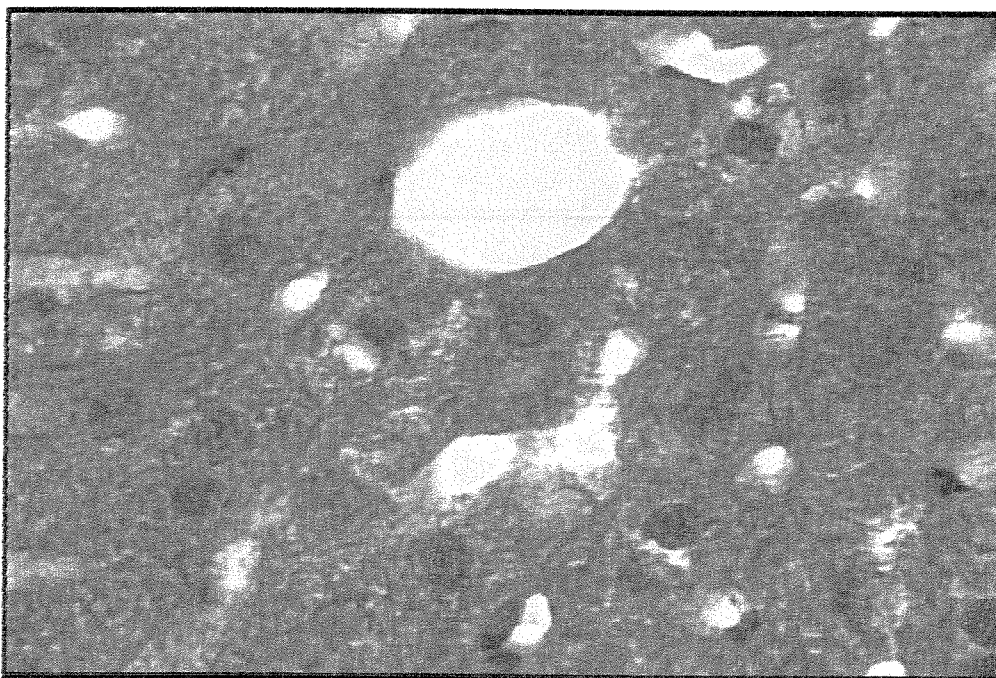


Figura 44. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (5). Notar semelhança com o subgrupo controle. HE (x1000).

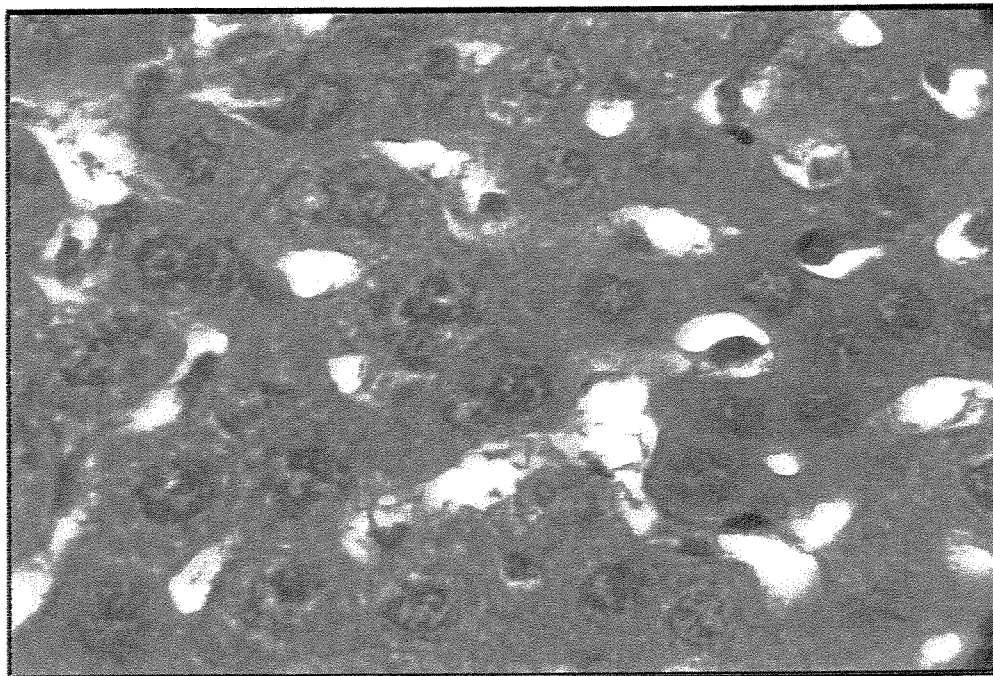


Figura 45. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (6). Notar hepatócitos alterados, com citoplasma vacuolizado e sinusóides dilatados. HE (x1000).

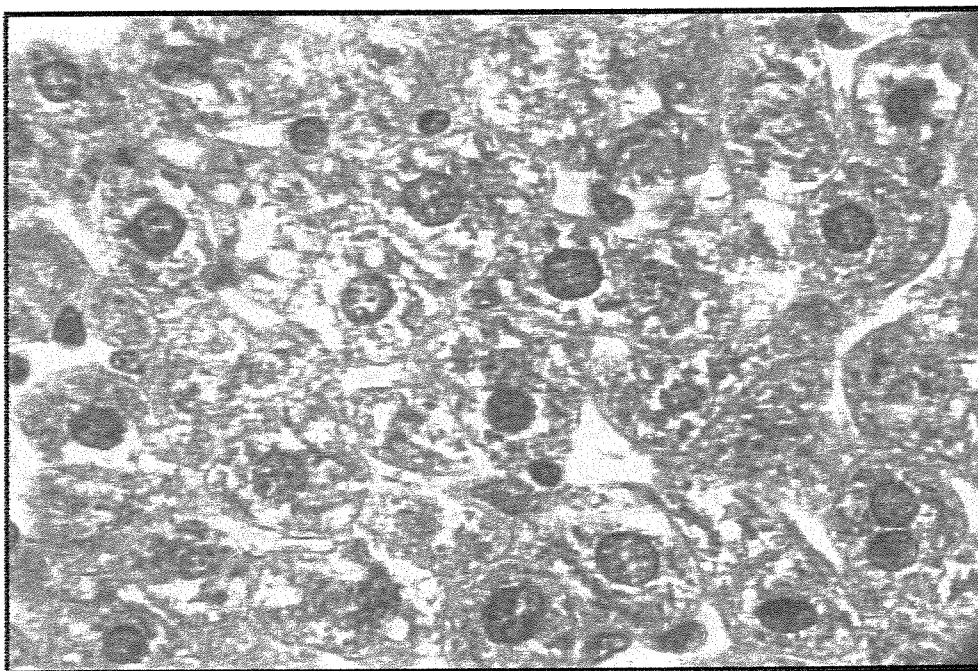


Figura 46. Fígado de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (7). Notar hepatócitos alterados com citoplasma vacuolizado. HE (x1000).

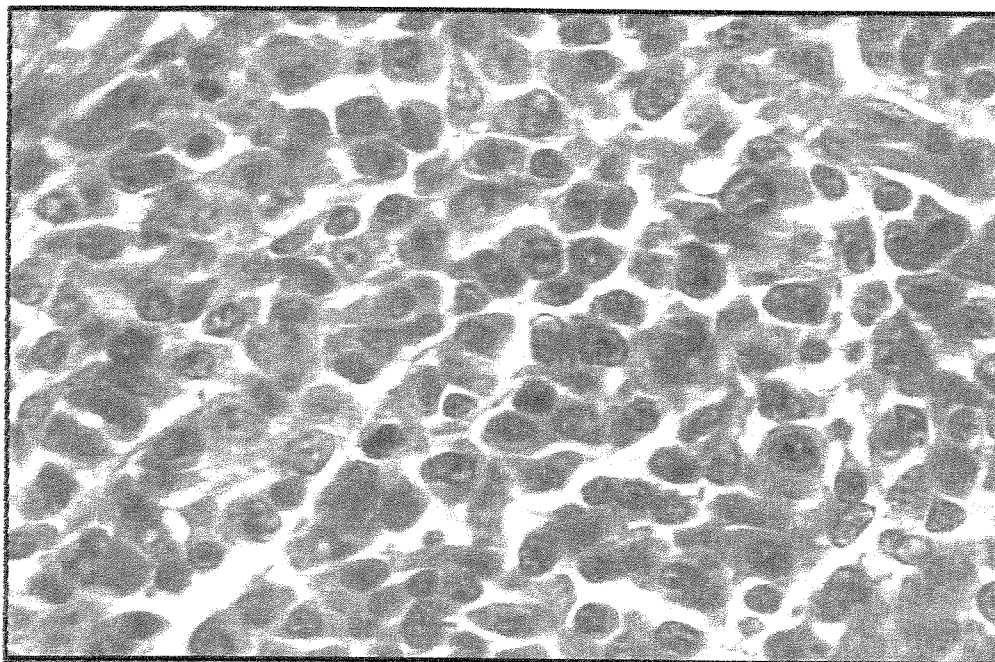


Figura 47. Baço de *Mus musculus* do controle sem infecção. HE (x1000).

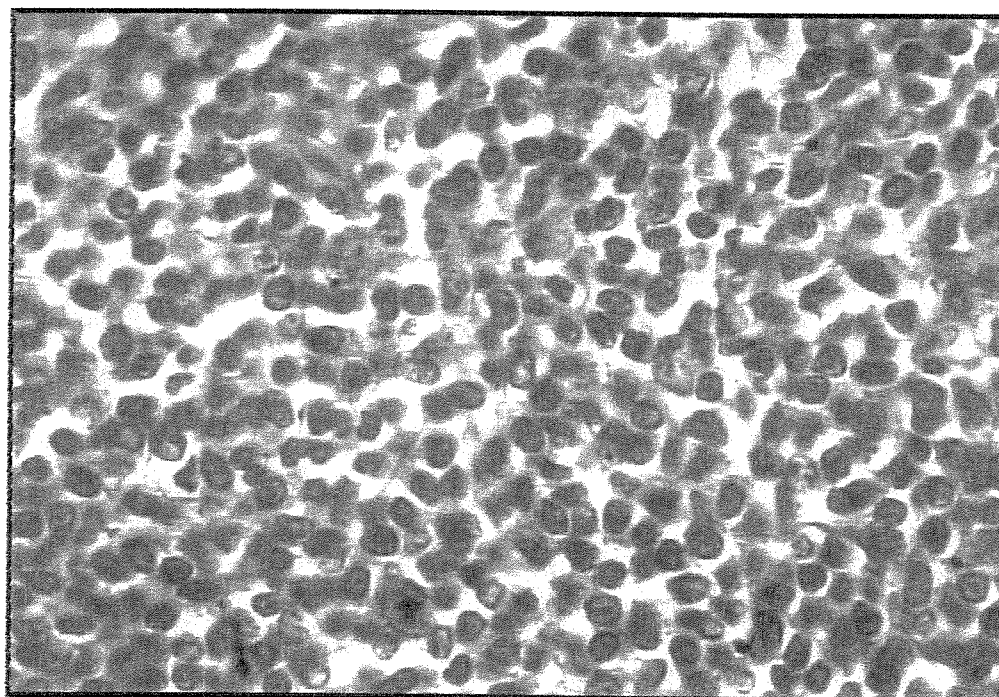


Figura 48. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (1). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

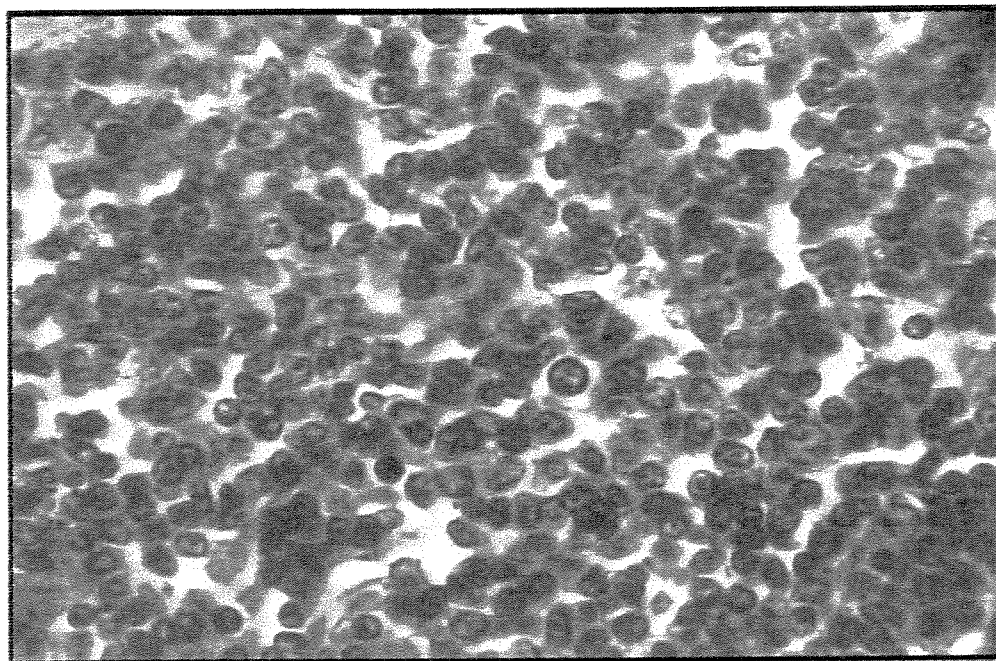


Figura 49. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (2). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

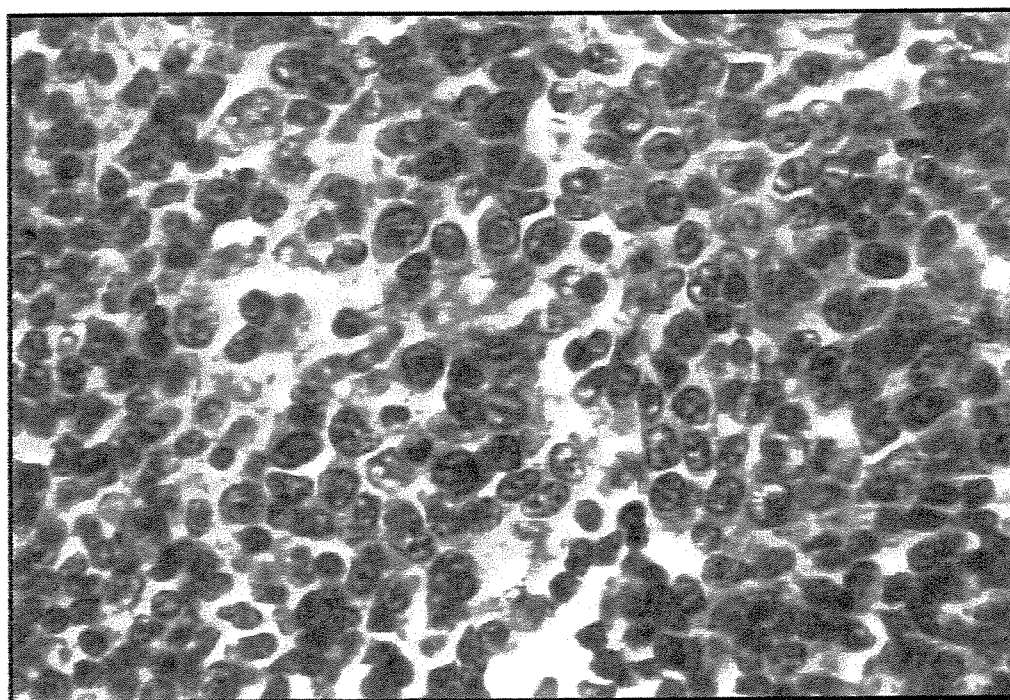


Figura 50. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (3). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

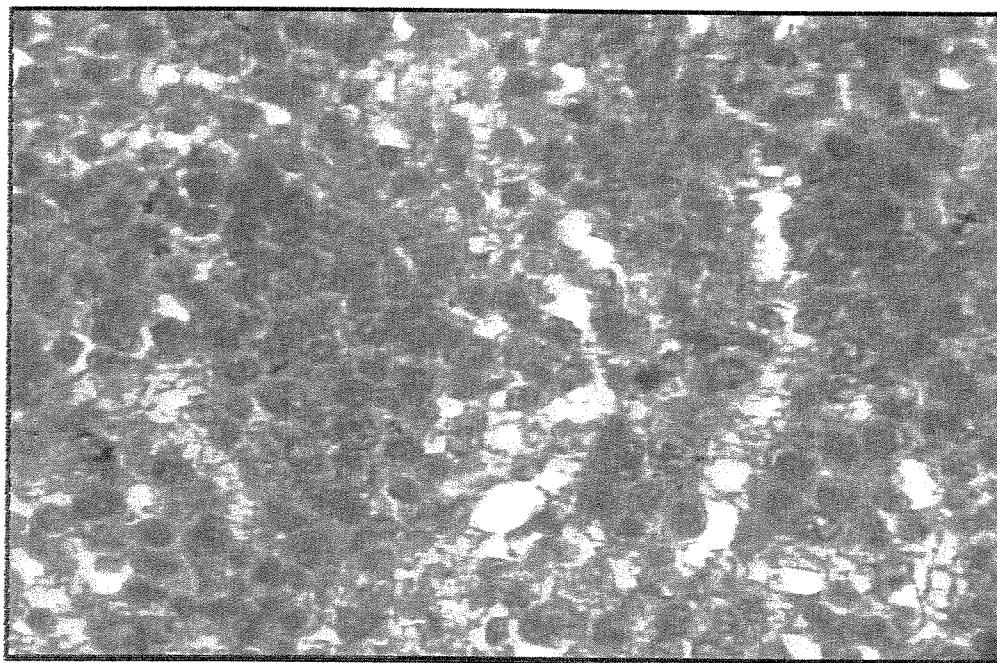


Figura 51. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (4). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

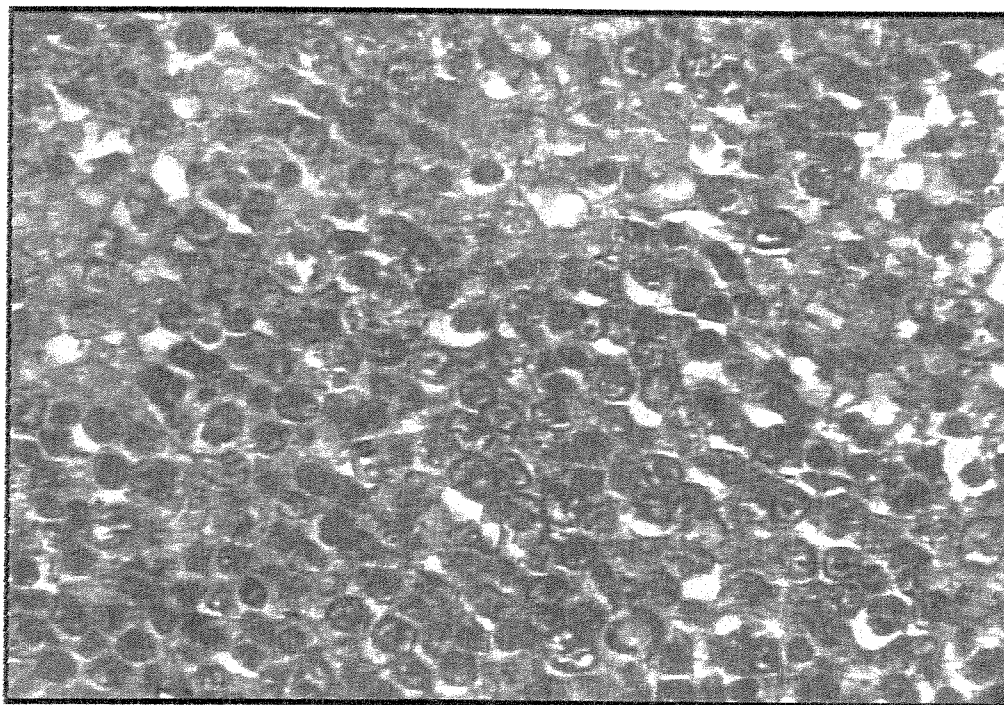


Figura 52. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (5). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

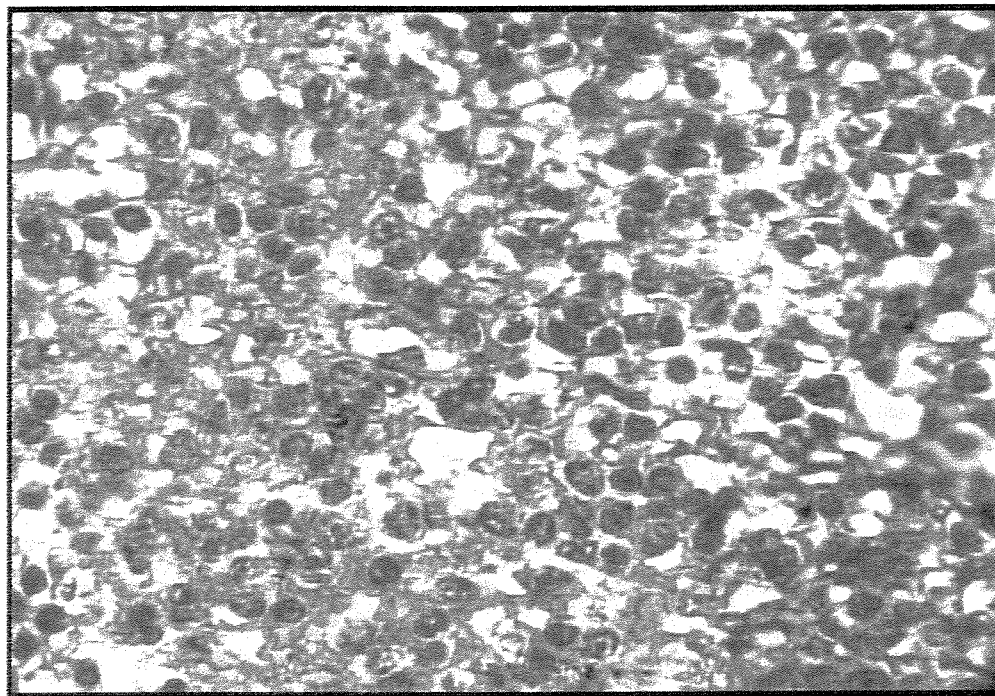


Figura 53. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (6). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

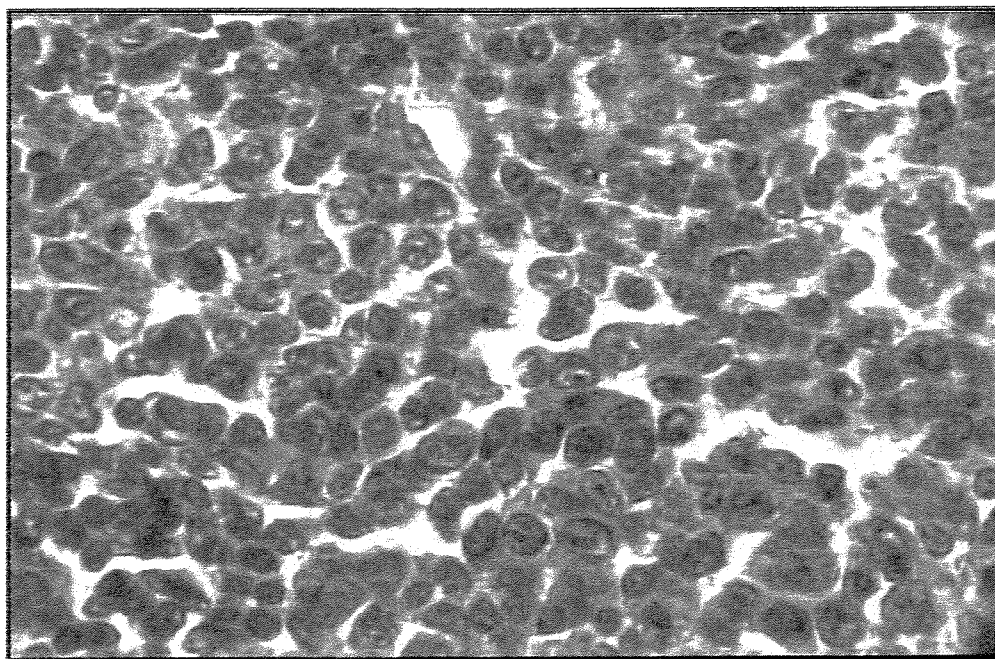


Figura 54. Baço de *Mus musculus* do subgrupo tratamento paralelo, tratado com a substância (7). Notar a desorganização tecidual. HE (x1000).

5.4.4. Análise Morfométrica

A análise morfométrica das células dos diferentes órgãos provenientes dos subgrupos estudados, demonstraram alterações significativas quando comparadas aos controles. As comparações morfométricas e os parâmetros nucleares dos tecidos avaliados nos diferentes grupos experimentais após o tratamento estão demonstrados nas Tabelas 4 a 18.

5.4.4.1. Comparação entre os Subgrupos Controle sem Infecção e Infectados

Os subgrupos infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, apresentaram alteração dos valores médios nucleares dos subgrupos infectados e tratados, quando comparados em relação ao controle sem infecção.

De uma maneira geral, os valores médios dos parâmetros nucleares das fibras cardíacas, demonstraram atrofia significativa, quando comparados com o subgrupo controle sem infecção, com exceção dos subgrupos tratados com as substâncias (3) e (7), representados na Tabela 4.

Esta mesma atrofia foi observada nos hepatócitos, para a maioria das substâncias, onde os valores médios apresentados na Tabela 5 mostraram-se menores em relação ao controle sem infecção, com exceção para o subgrupo tratado com a substância (3).

Em contrapartida, os esplenócitos demonstraram hipertrofia na maioria dos seus parâmetros nucleares, excluindo os subgrupos tratados pelas substâncias (2) e (3), cujos resultados não foram significativos (Tabela 6).

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do coração dos animais infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Comparação do grupo controle sem infecção com os grupos infectados, independentemente ao fato de terem sido submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos									
	CSI	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.07	0.08 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.05 ^{**}	0.06 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.05 ^{**}	0.07 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.06 ^{ns}
Perímetro	2.51	2.60 ^{ns}	2.59 ^{ns}	2.29 [*]	2.53 ^{ns}	2.50 ^{ns}	2.25 [*]	2.41 ^{ns}	2.39 ^{ns}	2.47 ^{ns}
Excentricidade	0.92	0.90 ^{**}	0.94 ^{**}	0.91 ^{ns}	0.93 ^{ns}	0.91 ^{ns}	0.92 ^{ns}	0.90 ^{**}	0.89 [*]	0.93 ^{ns}
Índice de Contorno	4.97	4.82 ^{ns}	5.24 ^{**}	4.90 ^{ns}	5.05 ^{ns}	4.88 ^{ns}	4.92 ^{ns}	4.70 [*]	4.68 [*]	5.00 ^{ns}
Área Nuclear	0.26	0.30 [*]	0.25 ^{ns}	0.23 [*]	0.26 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.21 [*]	0.27 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.25 ^{ns}
Relação V/A	0.23	0.26 [*]	0.21 ^{**}	0.22 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.21 ^{**}	0.25 ^{**}	0.25 ^{**}	0.22 ^{ns}
Coef. de Forma	0.52	0.56 [*]	0.47 [*]	0.54 [*]	0.50 ^{**}	0.54 [*]	0.53 ^{ns}	0.58 [*]	0.59 [*]	0.51 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

^{*}p < 0.01

^{**}p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do fígado dos animais infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Comparação do grupo controle sem infecção com os grupos infectados, independentemente ao fato de terem sido submetidos ao tratamento.

Subgrupos										
Parâmetros	CSI	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.33	0.13*	0.18*	0.16*	0.19*	0.22 ^{ns}	0.16*	0.20*	0.57*	0.18*
Perímetro	2.68	1.98*	2.18*	2.10*	2.22**	2.35 ^{ns}	2.10*	2.26 ^{ns}	3.58*	2.15*
Excentricidade	0.53	0.59*	0.61*	0.58*	0.57**	0.56 ^{ns}	0.58*	0.57**	0.60*	0.59*
Índice de Contorno	3.57	3.58 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.24*	3.58 ^{ns}
Área Nuclear	0.57	0.31*	0.38*	0.35*	0.39*	0.44 ^{ns}	0.35*	0.41*	0.35*	0.37*
Relação V/A	0.57	0.42*	0.46*	0.44**	0.47*	0.49 ^{ns}	0.44**	0.48**	0.44**	0.45*
Coef. de Forma	0.99	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do baço dos animais infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Comparação do grupo controle sem infecção com os grupos infectados, independentemente ao fato de terem sido submetidos ao tratamento.

Subgrupos										
Parâmetros	CSI	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.06	0.08**	0.07 ^{ns}	0.09*	0.06 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.08*	0.12*	0.09*	0.09*
Perímetro	1.53	1.69 ^{ns}	1.61 ^{ns}	1.71**	1.50 ^{ns}	1.56 ^{ns}	1.69 ^{ns}	1.88*	1.73**	1.77**
Excentricidade	0.62	0.61 ^{ns}	0.62 ^{ns}	0.60**	0.56*	0.60**	0.60**	0.59*	0.62 ^{ns}	0.61 ^{ns}
Índice de Contorno	3.60	3.59 ^{ns}	3.60 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.57 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}
Área Nuclear	0.18	0.23*	0.21*	0.23*	0.18 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.23*	0.28*	0.23*	0.25*
Relação V/A	0.32	0.35*	0.34**	0.36*	0.32 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.35*	0.39*	0.36*	0.37*
Coef. de Forma	0.97	0.97 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.97 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Os subgrupos infectados com a cepa Bolívia, apresentaram atrofia das fibras cardíacas, com exceção dos subgrupos tratados com as substâncias (5) e (6), onde os valores médios não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre o controle sem infecção (Tabela 7).

O volume, o perímetro, a excentricidade, a área e a relação V/A dos hepatócitos apresentaram atrofia quando comparados ao subgrupo controle sem infecção. Em contraposição o subgrupo controle negativo, apresentou ligeira hipertrofia quando comparadas ao grupo controle sem infecção, cuja avaliação estatística mostrou-se não significativa (Tabela 8).

Os parâmetros nucleares do baço, apresentaram valores médios não significativos, demonstrados na Tabela (9).

Tabela 7. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do coração dos animais infectados pela cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*. Comparação do grupo controle sem infecção com os grupos infectados independentemente ao fato de terem sido submetidos ao tratamento.

Subgrupos Parâmetros										
	CSI	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.07	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Perímetro	2.51	2.27*	2.34 ^{ns}	2.11*	2.10*	2.20*	1.99*	2.39 ^{ns}	2.40 ^{ns}	2.29*
Excentricidade	0.92	0.91 ^{ns}	0.92 ^{ns}	0.88*	0.88*	0.90**	0.87*	0.93 ^{ns}	0.91 ^{ns}	0.93 ^{ns}
Índice de Contorno	4.97	4.86 ^{ns}	4.96 ^{ns}	4.71*	4.66*	4.75*	4.64*	5.07 ^{ns}	4.97 ^{ns}	4.99 ^{ns}
Área Nuclear	0.26	0.22*	0.23**	0.20*	0.21*	0.22*	0.20*	0.24 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.21*
Relação V/A	0.23	0.22 ^{ns}	0.21**	0.22 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.21*
Coef. de Forma	0.52	0.54*	0.52 ^{ns}	0.59*	0.60*	0.57*	0.62*	0.51 ^{ns}	0.54*	0.51 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** dos animais infectados pela **cepa Bolívia** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação do grupo controle sem infecção com os grupos infectados, independentemente ao fato de terem sido submetidos ao tratamento.

Subgrupos Parâmetros	CSI	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.33	0.36 ^{ns}	0.23*	0.16*	0.19*	0.26*	0.15*	0.18*	0.13*	0.18*
Perímetro	2.68	3.50 ^{ns}	2.37 ^{ns}	2.11*	2.25*	2.45 ^{ns}	2.06*	2.21*	2.00*	2.18*
Excentricidade	0.53	0.57*	0.56*	0.59*	0.58*	0.54 ^{ns}	0.58*	0.55 ^{ns}	0.59*	0.55 ^{ns}
Índice de Contorno	3.57	3.83**	3.57 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.57 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.57 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.57 ^{ns}
Área Nuclear	0.57	0.60**	0.45*	0.35*	0.40*	0.48**	0.34*	0.38*	0.31*	0.38*
Relação V/A	0.57	0.60*	0.50*	0.44*	0.47*	0.52 ^{ns}	0.43*	0.46*	0.42*	0.46*
Coef. de Forma	0.99	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 9. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** dos animais infectados pela **cepa Bolívia** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação do grupo controle sem infecção com os grupos infectados, independentemente ao fato de terem sido submetidos ao tratamento.

Subgrupos Parâmetros	CSI	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.06	0.06 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Perímetro	1.53	1.55*	1.55*	1.52 ^{ns}	1.60*	1.58*	1.53 ^{ns}	1.54 ^{ns}	1.43*	1.46*
Excentricidade	0.62	0.60**	0.60**	0.60 ^{ns}	0.60**	0.58*	0.58*	0.56*	0.60**	0.57*
Índice de Contorno	3.60	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}
Área Nuclear	0.18	0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.20**	0.20**	0.18 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.17 ^{ns}
Relação V/A	0.32	0.33 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.34**	0.33 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.31 ^{ns}
Coef. de Forma	0.97	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

5.4.4.2.Comparação entre os Subgrupos infectados não tratados e infectados tratados

A comparação entre os mesmos parâmetros previamente expostos aos subgrupos submetidos ao tratamento diário e subgrupo controle negativo, demonstrou valores significativamente diferentes.

Através dos valores observados na Tabela (10), relativos à avaliação das fibras cardíacas, verificou-se que para os subgrupos infectados com a cepa Y do parasito e submetidos ao tratamento, apenas os tratados pelas substâncias (3), (5) e (6) não apresentaram alterações significativas do volume nuclear e do índice de contorno em relação ao subgrupo controle negativo. As demais substâncias, incluindo o subgrupo positivo, apresentaram grau de atrofia ainda superior àquela determinada pela ação de *T.cruzi*.

Os parâmetros nucleares dos hepatócitos, principalmente o volume e área nucleares, observou-se aumento destes valores para os subgrupos tratados, quando comparados com o subgrupo controle negativo, indicando que as substâncias empregadas, inclusive o benzonidazol, determinaram uma atenuação dos efeitos de indução de hipertrofia promovidos pela ação parasitária (Tabela 11).

Esse efeito, em menor intensidade, também pode ser observado nos parâmetros relativos às células esplênicas, onde apenas os valores apresentados pelas substâncias (2) e (5) mostraram-se aumentados em relação ao controle negativo. As demais substâncias não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos (Tabela 12).

Tabela 10. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** dos animais infectados pela **cepa Y** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação entre o grupo controle infectado com aquele de animais submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos								
	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.08	0.06**	0.05*	0.06**	0.07 ^{ns}	0.05*	0.07 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.06**
Perímetro	2.60	2.59 ^{ns}	2.29*	2.53 ^{ns}	2.50 ^{ns}	2.25*	2.41**	2.39**	2.47 ^{ns}
Excentricidade	0.90	0.94*	0.91 ^{ns}	0.93*	0.91 ^{ns}	0.92**	0.90 ^{ns}	0.89 ^{ns}	0.93*
Índice de Contorno	4.82	5.24*	4.90 ^{ns}	5.05*	4.88 ^{ns}	4.92 ^{ns}	4.70 ^{ns}	4.68 ^{ns}	5.00**
Área Nuclear	0.30	0.25*	0.23*	0.26*	0.27**	0.21*	0.27**	0.27**	0.25*
Relação V/A	0.26	0.21*	0.22*	0.22*	0.24 ^{ns}	0.21*	0.25 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.22*
Coef. de Forma	0.56	0.47*	0.54**	0.50*	0.54**	0.53*	0.58 ^{ns}	0.59**	0.51*

CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 11. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** dos animais infectados pela **cepa Y** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação entre o grupo controle infectado com aquele de animais submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos								
	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.13	0.18*	0.16**	0.19*	0.22*	0.16**	0.20*	0.57*	0.18*
Perímetro	1.98	2.18**	2.10 ^{ns}	2.22*	2.35*	2.10 ^{ns}	2.26*	3.58*	2.15 ^{ns}
Excentricidade	0.59	0.61 ^{ns}	0.58 ^{ns}	0.57*	0.56*	0.58 ^{ns}	0.57*	0.60 ^{ns}	0.59 ^{ns}
Índice de Contorno	3.58	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.24**	3.58 ^{ns}
Área Nuclear	0.31	0.38*	0.35*	0.39*	0.44*	0.35*	0.41*	0.35*	0.37*
Relação V/A	0.42	0.46*	0.44**	0.47*	0.49*	0.44**	0.48*	0.44**	0.45*
Coef. de Forma	0.98	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 12. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** dos animais infectados pela **cepa Y** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação entre o grupo controle infectado com aquele de animais submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos								
	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.08	0.07 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.06 ^{**}	0.07 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.12 [*]	0.09 ^{ns}	0.09 ^{ns}
Perímetro	1.69	1.61 ^{ns}	1.71 ^{ns}	1.50 ^{**}	1.56 ^{ns}	1.69 ^{ns}	1.88 ^{ns}	1.73 ^{ns}	1.77 ^{ns}
Excentricidade	0.61	0.62 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.56 [*]	0.60 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.59 ^{**}	0.62 ^{ns}	0.61 ^{ns}
Índice de Contorno	3.59	3.60 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.57 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}
Área Nuclear	0.23	0.21 ^{**}	0.23 ^{ns}	0.18 [*]	0.19 [*]	0.23 ^{ns}	0.28 ^{**}	0.23 ^{ns}	0.25 ^{**}
Relação V/A	0.35	0.34 ^{ns}	0.36 ^{ns}	0.32 [*]	0.33 ^{**}	0.35 ^{ns}	0.39 [*]	0.36 ^{ns}	0.37 ^{ns}
Coef. de Forma	0.97	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.97 ^{ns}

CI = controle infectado; B = controle com benzonidazol; SB = substância

^{*} p < 0.01

^{**} p < 0.05

^{ns} não significativo

Em relação aos subgrupos infectados com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, observou-se que as alterações patogênicas diferenciaram-se dos subgrupos infectados com a cepa Y. Os parâmetros nucleares das fibras cardíacas, não foram significativos quando comparados com o subgrupo controle negativo. Apenas a substância (4), demonstrou na Tabela (13), atrofia dos parâmetros nucleares.

No fígado, o volume e área nucleares, e a relação V/A dos hepatócitos, apresentaram atrofia estatisticamente significativa em relação ao subgrupo controle negativo (Tabela 14).

Analisando a Tabela 15, cujos dados referem-se às células esplênicas, constatou-se uma baixa significância entre os subgrupos comparados. Isso demonstrou alterações das características celulares determinadas principalmente pelo parasitismo e pelo tropismo das cepas.

Tabela 13. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** dos animais infectados pela **cepa Bolívia** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação entre o grupo controle infectado com aquele de animais submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos								
	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.05	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Perímetro	2.27	2.34 ^{ns}	2.11 ^{ns}	2.10 ^{ns}	2.20 ^{ns}	1.99*	2.39 ^{ns}	2.40**	2.29 ^{ns}
Excentricidade	0.91	0.92 ^{ns}	0.88*	0.88*	0.90 ^{ns}	0.87*	0.93**	0.91 ^{ns}	0.93**
Índice de Contorno	4.86	4.96 ^{ns}	4.71 ^{ns}	4.66**	4.75 ^{ns}	4.64**	5.07*	4.97 ^{ns}	4.99**
Área Nuclear	0.22	0.23 ^{ns}	0.20**	0.21 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.20**	0.24**	0.25*	0.21 ^{ns}
Relação V/A	0.22	0.21 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.21 ^{ns}
Coef. de Forma	0.54	0.52*	0.59*	0.60*	0.57**	0.62*	0.51*	0.54 ^{ns}	0.51*

CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 14. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** dos animais infectados pela **cepa Bolívia** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação entre o grupo controle infectado com aquele de animais submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos								
	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.36	0.23*	0.16*	0.19*	0.26*	0.15*	0.18*	0.13*	0.18*
Perímetro	3.50	2.37*	2.11*	2.25*	2.45**	2.06*	2.21*	2.00*	2.18*
Excentricidade	0.57	0.56 ^{ns}	0.59**	0.58 ^{ns}	0.54*	0.58 ^{ns}	0.55**	0.59**	0.55**
Índice de Contorno	3.83	3.57	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.57**	3.58 ^{ns}	3.57**	3.58 ^{ns}	3.57**
Área Nuclear	0.60	0.45*	0.35*	0.40*	0.48*	0.34*	0.38*	0.31*	0.38*
Relação V/A	0.60	0.50*	0.44*	0.47*	0.52**	0.43*	0.46*	0.42*	0.46*
Coef. de Forma	0.97	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CN = controle infectado; CP = controle com benzonidazol; SB = substância

*p < 0.01

**p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 15. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** dos animais infectados pela **cepa Bolívia** de *Trypanosoma cruzi*. Comparação entre o grupo controle infectado com aquele de animais submetidos ao tratamento.

Parâmetros	Subgrupos								
	CN	CP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.06	0.06 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Perímetro	1.55	1.55 ^{ns}	1.52 [*]	1.60 [*]	1.58 ^{**}	1.53 [*]	1.54 ^{ns}	1.43 [*]	1.46 [*]
Excentricidade	0.60	0.60 ^{ns}	0.61 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.58 ^{**}	0.58 ^{**}	0.56 [*]	0.60 ^{ns}	0.57 [*]
Índice de Contorno	3.59	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}
Área Nuclear	0.19	0.19 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.16 [*]	0.17 ^{**}
Relação V/A	0.33	0.33 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.30 [*]	0.31 ^{**}
Coef. de Forma	0.98	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CN = controle infectado; CP= controle com benzonidazol; SB = substância

^{*} p < 0.01

^{**} p < 0.05

^{ns} não significativo

5.4.4.3. Comparação entre os subgrupos sem infecção e Tratamento

Paralelo

A comparação dos valores obtidos entre os subgrupos controle sem infecção e Tratamento Paralelo, submetidos ao tratamento diário pelas substâncias em estudo, apresentaram alterações significativas nos tecidos estudados (Tabelas 16 a 18).

O subgrupo tratado com a substância (1), demonstrou uma alteração hipertrófica do volume nuclear das fibras cardíacas em nível de significância para $p < 0,05$. Já as substâncias (2), (3) e (5), induziram atrofia deste mesmo parâmetro nuclear. As demais substâncias não mostraram alterações significativas.

De acordo com os valores médios apresentados na Tabela 17, referente aos núcleos das células hepáticas, praticamente todas as substâncias demonstraram exercer algum tipo de alteração, sendo que as substâncias (4) e (5), induziram hipertrofia celular.

Para as células esplênicas, apenas a substância (4) demonstrou indução de hipertrofia, sendo que as demais não determinaram alterações significativas.

Tabela 16. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** de animais submetidos à avaliação toxicológica pelos derivados da N-aminometilftalimida em relação ao grupo controle, sem tratamento.

Subgrupos Parâmetros								
	CSI	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.07	0.10**	0.05**	0.05**	0.06 ^{ns}	0.04*	0.08 ^{ns}	0.06 ^{ns}
Perímetro	2.51	2.45 ^{ns}	2.31**	2.27*	2.54 ^{ns}	2.14*	2.12*	2.48 ^{ns}
Excentricidade	0.92	0.80*	0.92 ^{ns}	0.92 ^{ns}	0.94**	0.92 ^{ns}	0.80*	0.91 ^{ns}
Índice de Contorno	4.97	4.55*	4.91*	4.85*	5.20*	4.93*	4.43*	5.17*
Área Nuclear	0.26	0.31 ^{ns}	0.23*	0.22*	0.25 ^{ns}	0.19*	0.25 ^{ns}	0.24*
Relação V/A	0.23	0.30**	0.22 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.21**	0.20*	0.27 ^{ns}	0.21**
Coef. de Forma	0.52	0.65*	0.53 ^{ns}	0.54*	0.48*	0.53 ^{ns}	0.67*	0.50**

CSI = controle sem infecção; SB = substância

* p < 0.01

** p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 17. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **figado** de animais submetidos à avaliação toxicológica pelos derivados da N-aminometilftalimida em relação ao grupo controle, sem tratamento.

Parâmetros	Subgrupos							
	CSI	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Volume Nuclear	0.33	0.26 ^{ns}	0.20*	0.21*	0.51*	0.34 ^{ns}	0.21*	0.18*
Perímetro	2.68	2.47*	2.25*	2.33*	3.90*	3.44*	2.32*	2.20*
Excentricidade	0.53	0.57*	0.57*	0.55**	0.54 ^{ns}	0.57*	0.54 ^{ns}	0.53 ^{ns}
Índice de Contorno	3.57	3.58 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.57 ^{ns}	1.96**	3.75*	3.57 ^{ns}	3.57 ^{ns}
Área Nuclear	0.57	0.48**	0.40*	0.43*	0.89*	0.65**	0.43*	0.38*
Relação V/A	0.57	0.52*	0.47*	0.49*	0.57 ^{ns}	0.52*	0.49*	0.46*
Coef. de Forma	0.99	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.99 ^{ns}

CSI= controle sem infecção; SB = substância

* p < 0.01

** p < 0.05

^{ns} não significativo

Tabela 18. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** de animais submetidos à avaliação toxicológica pelos derivados da N-aminometilftalimida em relação ao grupo controle, sem tratamento.

Parâmetros	Subgrupos							
	CSI	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Volume Nuclear	0.06	0.08 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.17*	0.06 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Perímetro	1.53	1.54**	1.47*	1.41*	3.70*	1.52 ^{ns}	1.42*	1.42*
Excentricidade	0.62	0.60 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.58*	0.59*	0.55*	0.57*	0.59*
Índice de Contorno	3.60	3.75 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58**	4.08**	3.57*	3.58**	3.59 ^{ns}
Área Nuclear	0.18	0.29 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.16**	0.48*	0.18 ^{ns}	0.16**	0.16**
Relação V/A	0.32	0.32 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.30**	0.35*	0.32 ^{ns}	0.30**	0.30**
Coef. de Forma	0.97	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.96 ^{ns}	0.99**	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

CSI = controle sem infecção; SB = substância

* p < 0.01

** p < 0.05

^{ns} não significativo

Muitos autores que realizaram estudos quimioterápicos experimentais em relação ao *T.cruzi*, efetuando comparações entre cepas distintas, observaram existir níveis de atividades diferentes de uma mesma substância, ou seja, a ocorrência natural de cepas do parasito com distintas suscetibilidades ao agente quimioterápico.

Não se dispõe ainda de explicações para essas diferenças, entretanto, deve-se ressaltar que a interação de *T.cruzi* com o hospedeiro vertebrado é complexa e dependente de uma série de fatores, levando a diferentes manifestações patogênicas, diversos mecanismos de resposta imunológica e às alterações do metabolismo de *T.cruzi* e do hospedeiro, de acordo com a população em estudo.

A resposta imune do hospedeiro é influenciada por características do parasito. Sendo assim, cepas distintas possuem constituição antigênica diferente, provocando distintos tipos de resposta imune do hospedeiro (ANDRADE et al., 1985 a).

Nas infecções experimentais em camundongos, as cepas classificadas como *T.cruzi* II (Zimodema 2) são mais virulentas quando comparadas com as cepas do *T.cruzi* I, equivalente ao Zimodema 1. (YOSHIDA, 1983; RUIZ et al., 1998).

Os resultados apresentados neste trabalho, confirmam estas diferenças relatadas na literatura, entre as diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, tanto nos ensaios “in vivo” como na análise histológica e morfométrica.

6. CAPÍTULO III

Indução dos Derivados da N-aminometilftalimida na produção de Óxido Nítrico (NO)

6.1. Resumo

O óxido nítrico parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento da infecção por *Trypanosoma cruzi*, onde os macrófagos são importantes tanto mediando a resposta imune contra o parasito, bem como mediando a imunossupressão. Quando os macrófagos são estimulados pelo IFN- γ , TNF- α e LPS (Lipopolysacaride), estes aumentam a capacidade de destruição dos parasitas intracelulares através da produção do NO (Óxido Nítrico). Sabendo da importância do NO sobre o controle da infecção ou até mesmo na destruição dos parasitas, foi realizada a análise da atividade dos derivados da N-aminometilftalimida sobre os macrófagos peritoneais, obtidos de *Mus musculus*, com o objetivo de verificar a inibição ou indução da produção de NO por estas substâncias. Os dados obtidos, revelaram aumento na indução da produção de NO por parte dos macrófagos tratados com estas substâncias, quando comparados ao controle com IFN- γ e LPS.

6.2.Introdução

A tripanosomíase americana é uma zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*. Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem 16 a 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas (RASSI et al., 1999), e muitas pessoas correm o risco de serem infectadas. Esta infecção parece ter relação direta com as condições sócio-econômicas baixas, permitindo o contato destes indivíduos com o vetor deste parasita (ORITHEL & ASH, 1995).

A forma tripomastigota, pode potencialmente penetrar em qualquer tipo celular, incluindo macrófagos e desenvolver-se em seu interior, com exceção dos neutrófilos e eosinófilos (SOUZA, 2000).

Os macrófagos e as células T desempenham uma importante função no controle da infecção chagásica (NATHAN et al., 1979). As células T ativadas, sinalizam positivamente a capacidade dos macrófagos em destruir os parasitas intracelulares, de acordo com a cepa do parasita (ALCINA & FRESNO, 1987). O mais importante sinal para a ativação dos macrófagos é o IFN- γ , que tem sido considerado como um importante fator para a destruição de *T. cruzi* (PLATA et al., 1984; MURRAY et al., 1985). Outros citocinas, como o TNF- α e fatores inespecíficos, como o LPS, podem estar envolvidos no processo de ativação dos macrófagos (ALCINA & FRESNO, 1987).

Quando os macrófagos são ativados, estes liberam NO através da conversão da L-arginina em L-citrulina. Durante este processo, o oxigênio e o NADPH são cofatores necessários (GARCIA et al., 1999).

O Óxido Nítrico está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, como a vasodilatação sanguínea , agregação de plaquetas e neurotransmissão (MONCADA et al., 1991). É considerado também como uma importante molécula efetora antimicrobicida em macrófagos contra patógenos intracelulares, incluindo: *Leishmania major* (LIEW et al., 1991; EVANS et al., 1996), *Toxoplasma gondii* (ADAMS et al., 1990) e *Trypanosoma cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992; VESPA et al., 1994; JAMES, 1995).

Apesar da participação positiva das citocinas no processo de controle da infecção por *T. cruzi*, estas não conferem uma resistência completa, podendo alguns microorganismos persistirem ou induzirem uma infecção subpatente, possivelmente resultando em uma doença crônica. O aumento dos níveis da produção de NO pelos macrófagos pode induzir a elevação da destruição e até mesmo a eliminação total destes parasitas intracelulares (GOLDEN & TARLETON, 1991; NORRIS et al. 1995). PETRAY et al. (1994), relataram que o aumento dos níveis da produção do NO, está relacionado com a redução da parasitemia em camundongos experimentalmente infectados. Portanto, o tratamento dos camundongos infectados com *T.cruzi*, com inibidores da síntese de NO, agrava a infecção. E a quantidade de NO liberado pelos macrófagos de camundongos suscetíveis é mais elevado do que em camundongos resistentes (VESPA et al., 1994).

Além das vantagens proporcionadas pelo NO em relação aos parasitas, foi comprovado que altos níveis podem desempenhar uma ação patogênica ao indivíduo infectado, incluindo a depressão da função do miocárdio e causar a morte celular (KELLY et al., 1996; CHANDRASEKAR et al., 2000).

CHANDRASEKAR et al. (1998), relataram que elevados níveis de NO podem induzir um aumento do processo inflamatório nos tecidos. Sendo assim, a produção do NO pode estar relacionada com a patologia da doença de Chagas, caracterizada por miocardites e danos inflamatórios no músculo cardíaco.

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi*, via peroxidase, Óxido Nítrico e produção de peroxinitrito. Este último demonstrou-se altamente citotóxico contra as formas epimastigotas deste parasita (THOMSON et al., 1999).

A cloroquina é uma das melhores drogas antimaláricas (SLATER, 1993), podendo afetar várias funções dos macrófagos, como a inibição da fagocitose (ANTONI et al., 1986), e a transcrição do TNF- α (ZHU et al., 1993). HRABÁK et al. (1998) trabalhando com cultura de macrófagos peritoniais de ratos infectados por *T. cruzi*, observaram que a cloroquina bloqueou a formação do NO.

O IFN- γ sozinho ou juntamente com o TNF- α , é o mais potente ativador de macrófagos na atividade microbicida para vários parasitas, incluindo *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995). Portanto o tratamento com IFN- γ aumenta a sobrevivência de camundongos infectados na fase aguda, através da elevação da síntese de NO pelos macrófagos ativados (NORRIS et al., 1995).

Portanto, a multiplicação intracelular de *T. cruzi* “in vivo” e “in vitro” pode ser controlada pela síntese do NO. Em camundongos, as citocinas que induzem a produção de NO, atingem o seu nível máximo no plasma entre o 8° - 12° dias após à infecção (MARTINS et al., 1998). Além disso, foi verificado que macrófagos de camundongos

infectados com duas cepas de *T.cruzi*, diferem nas suas respostas, em relação as citocinas e na produção do NO (PAKIANATHAN, 1994).

Sabe-se que o IFN- γ , o TNF- α e o LPS, desempenham importante papel sobre a síntese do Óxido Nítrico pelos macrófagos, e consequentemente, controlando a infecção chagásica. SHIBATA et al. (1996) e MIYACHI et al. (1997) relataram que os derivados da ftalimida exercem um importante papel sobre o controle da produção de TNF- α , podendo desta maneira influenciar a produção do NO. Baseados nos resultados anteriores, o presente trabalho verificou a capacidade de produção ou inibição do NO pelos derivados da N-aminometilftalimida.

6.3. Material e Métodos

6.3.1. Substâncias analisadas

Os derivados da N-aminometilftalimida foram sintetizados através da reação da N-aminoftalimida com amidas aromáticas, com base na técnica descrita por WISTEWAD & HEINE (1955) E NASI (1989).

Em capela, foram adicionados em um erlenmeyer, piridina e a N-aminoftalimida. Ao sistema, em constante agitação, foi adicionado lentamente a amida aromática. Após o término da adição, o sistema foi fechado com rolha de borracha, e a agitação foi mantida até não se observar mais a presença de sólido no sistema. Em seguida, foi adicionada água destilada em excesso, com a finalidade de interromper a reação e

promover a precipitação da amida. A amida obtida foi filtrada em büchner, lavada com excesso de água destilada e secada à temperatura ambiente.

A avaliação quantitativa do desenvolvimento da reação entre a N-aminoftalimida e as amidas aromáticas foi realizada através dos intervalos de fusão e espectro de infravermelho.

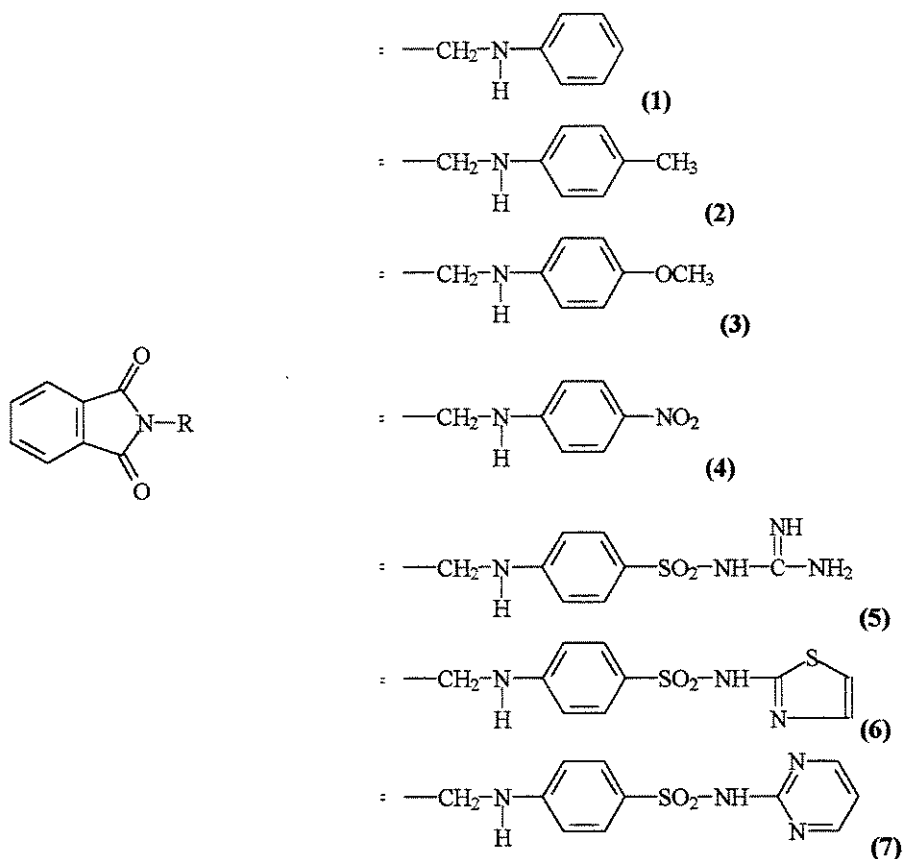


Figura 1. Aspecto estrutural dos derivados da Ftalimida avaliados: (1).N-(fenil)amino metilftalimida; (2).N-(4-metilfenil)aminometilftalimida; (3).N-(4-metoxifenil) aminometilftalimida; (4).N-(4-nitrofenil)aminometilftalimida; (5).N-(4-benzeno sulfonilguanidil)aminometilftalimida; (6).N-[4-benzenosulfonil-(2-tiazolil) amino]aminometilftalimida; (7).N-[4-benzenosulfonil-(2-pirimidil)amino] aminometilftalimida.

6.3.2. Técnica do Óxido Nítrico

Camundongos albinos, da linhagem Swiss, receberam 1 mL de tioglicolato 3% via intraperitoneal, 96 horas antes de serem sacrificados e terem a cavidade peritoneal lavada com 5mL de RPMI estéril. O lavado foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” foi ressuspenso em 1mL de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico (Penicilina e Estreptomicina). Desta suspensão foi retirada alíquota de 10µL e diluída em solução de Azul de Tripán, para contagem das células viáveis. Foram distribuídas aproximadamente 2×10^5 células por poço em placa de 96 “wells” e levadas à estufa contendo 5% de CO₂, durante 30 minutos, a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se ao meio rico contendo RPMI, soro bovino fetal, IFN-γ e LPS (30ng/mL), que foram utilizados como controle negativo. Para comparação dos dados obtidos do grupo controle negativo, foram divididos mais dois grupos: Grupo controle positivo (RPMI, soro bovino fetal, IFN-γ, LPS e a substância em análise); e outro, Grupo tratado (RPMI, soro bovino fetal e a substância em análise). As substâncias utilizadas foram diluídas em Tween 20, 1µL para cada 10µg e adicionadas ao meio contendo RPMI e soro bovino fetal na quantidade de 10µL/poço (PETRAY et al., 1994; HRABÁK et al., 1998). Após 24 horas, a placa foi centrifugada a 1500 rpm durante 4 minutos e 100µL do sobrenadante foi recolhido e transferido para outra placa de 96 poços. Adicionou-se então volume igual de reagente de Griess (GREEN et al., 1982), permitindo a leitura da absorbância, utilizando-se filtro de 540nm.

6.4. Resultados e discussão

A Figura (1) demonstra os resultados obtidos em relação à absorbância para a produção de nitrito.

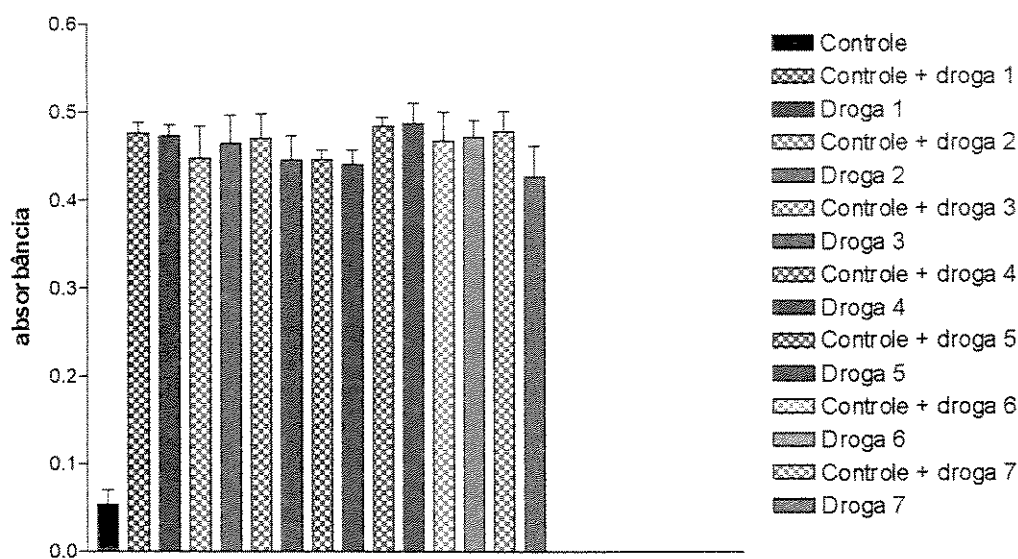


Figura 1. Análise da produção celular de Óxido Nítrico, por absorbância, após 24 horas da adição dos derivados da N-aminometilftalimida em cultura de macrófagos peritoneais, obtidos de *Mus musculus*.

Pela avaliação gráfica visual, podemos observar um comportamento significativo de todos os grupos de tratamento em relação ao grupo controle.

As amostras tratadas com INF- γ associado ao LPS (controle positivo) demonstraram, aumento significativo da expressão de NO. Diferentemente, todas as

amostras tratadas com os derivados da N-aminometilftalimida induziram a produção de altos níveis de nitrito, superior ao determinado pelo grupo controle.

Tal fato é também retratado quando submetemos os resultados obtidos à avaliação estatística pelo método de ANOVA. Para todos os grupos do tratamento, verificamos uma significância de $p < 0,001$, em relação ao grupo controle.

Os resultados aqui obtidos corroboram os observados por MIYACHI et al. (1997) e SHIBATA et al. (1996), onde verificaram que os derivados da ftalimida e fenilftalimida exercem importante papel sobre o controle da produção de TNF (Tumor Necrosis Factor).

De acordo com GATELY & MULQUEE (1996) e SIQUEIRA-BATISTA et al. (1996), o *T. cruzi* ao realizar seu ciclo no hospedeiro vertebrado, invade macrófagos e outras células, desencadeando uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro. Uma cascata de eventos é provocada e os macrófagos ativados, promovem liberação de IL-12, que por sua vez ativa as células NK ("natural killer") a produzirem a citocina IFN- γ . Assim, as citocinas produzidas ativam a expressão da enzima Óxido Nítrico sintase, induzida em macrófagos, promovendo consequentemente, um aumento na produção de NO, altamente tóxico para o *T. cruzi*, sendo visto como um microbicida intracelular (SALVEMI & MOLLACE, 1994).

Levando-se em consideração que a produção de Óxido Nítrico (NO), possui significativa importância na imunidade do hospedeiro no decurso da infecção chagásica (ABRAHAMSOHM & COFFMAN, 1996; TRUYENS et al., 1995), as substâncias

avaliadas no presente trabalho demonstraram possuir uma atividade bem semelhante àquela observada no emprego do $\text{TNF-}\alpha$.

Segundo OLIVEIRA et al. (1997), as diferentes cepas do parasita induzem a produção de altos níveis de NO, sendo menos resistentes à infecção chagásica. Isto sugere que o aumento da capacidade da produção do NO pode ser um dos fatores envolvidos na resistência à infecção parasitária.

A capacidade de induzir a produção de Óxido Nítrico pelos derivados de ftalimida possibilita-nos aventar a hipótese de que estas substâncias poderiam atuar positivamente no controle da resposta imune por parte do hospedeiro.

No entanto, não podemos afirmar, ser esse o principal mecanismo de ação sobre o parasito, o que necessitaria de outras avaliações mais precisas e direcionadas às diferentes rotas bioquímicas do metabolismo de *T.cruzi*. Mas certamente é uma indicação de que possíveis alterações estruturais deste grupamento possa gerar, futuramente, uma nova classe de interesse na pesquisa de novos fármacos antiparasitários.

Por outro lado, as alterações teciduais observadas nos subgrupos Tratamento Paralelo, citados no Capítulo 2, podem estar relacionadas aos altos níveis de produção de NO, induzidos pelos derivados da ftalimida, o que poderia estar ocasionando efeitos tóxicos celulares.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- ♦ A síntese dos derivados da N-aminometilftalimida, ocorreu adequadamente, considerando os intervalos de fusão e os espectros de infravermelho, conforme já foi relatado na literatura;
 - ♦ A Atividade Biológica “in vitro” dos derivados da N-aminometilftalimida sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* demonstrou que a substância (3) apresentou melhor atividade sobre a cepa Y, na concentração de 1.000µg/mL, e a substância (4) causou a lise de 100% dos parasitas da cepa Bolívia na concentração de 500µg/mL. Portanto, podemos considerar que estes derivados possuem considerável potencial tripanocida em termos de utilização na terapêutica, pois as substâncias apresentaram baixo IC₅₀ para as duas cepas do parasito.
 - ♦ Em relação às formas epimastigotas, verificou-se através dos dados obtidos nos ensaios “in vitro”, que as substâncias (1), (3), (4) e (5) para a cepa Y e (1), (3), (4), (5), (6) e (7) para a cepa Bolívia, demonstraram inibição no desenvolvimento do parasito a partir da concentração de 250µg/mL, quando comparadas com os subgrupos controles. Deste modo, a maioria das substâncias apresentaram atividade sobre as formas epimastigotas, indicando que neste trabalho, estas foram mais suscetíveis à ação dos derivados da N-aminometilftalimida do que as formas tripomastigotas.
 - ♦ No ensaio “in vivo”, a substância (7) demonstrou melhor atividade, reduzindo a parasitemia dos animais infectados com a cepa Y, e as substâncias (1), (2) e (3)
-

promoveram os mesmos efeitos para a cepa Bolívia. Apesar destes resultados, nenhuma das substâncias testadas determinaram a cura parasitológica dos animais tratados.

- ♦ Para ambas as cepas e para todos os grupos experimentais, a presença de ninhos de amastigotas, foi positiva mesmo para os animais que apresentaram baixa parasitemia.
 - ♦ Histologicamente, a análise toxicológica dos derivados da N-aminometilftalimida, através da histopatologia, demonstrou que morfometricamente, estas substâncias promoveram hipertrofia e atrofia dos núcleos celulares.
 - ♦ Baseando-se na análise morfométrica, os subgrupos estudados demonstraram alterações significativas, quando comparados aos subgrupos controles.
 - ♦ De acordo com todos os resultados observados, as cepas apresentaram diferenças na resposta ao tratamento com os derivados da N-aminometilftalimida, em busca de novas substâncias que possam combater o *Trypanosoma cruzi*, confirmando o que já foi relatado por vários autores.
 - ♦ Os derivados da N-aminometilftalimida induziram altos níveis de produção de NO, quando comparados com o grupo controle.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamsohn, I.A. & Coffman, R.L. Cytokine and Nitric Oxide regulation of the Immunosuppression in *Trypanosoma cruzi*. **J. Imm.** 155: 3955-63, 1995.

Abrahamsohn, I.A. & Coffman, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.** 84: 231-44, 1996.

Abrahão, A.A.C. Estudo morfológico, morfométrico e esteriológico da placenta e tecidos fetais, na transmissão transplacentária de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Instituto de Biologia. **Tese de Doutorado**, Campinas, 2000.

Adams, L.B.; Hibbs, J.B.; Taintor, R.R.; Krahenbuhl, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen from L-arginine. **J. Imm.** 144: 2725-9, 1990.

Albuquerque, S. Sínteses e ensaios biológicos de derivados da ftalimida em doença de Chagas experimental. Universidade Estadual de São Paulo – USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. **Dissertação de Mestrado**, 1995.

Albuquerque, S. Estudo morfológico, morfométrico e esteriológico das alterações presentes nas glândulas salivares maiores e acessórias do camundongo infectado com *Trypanosoma cruzi*. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Instituto de Biologia. **Tese de Doutorado**, Campinas, 1998.

Albuquerque, S; Nasi, A.M.T.T.; Ribeiro, R.D.; Lopes, R.A.; Carraro, A.A.; Rodrigues, E.R. In vitro effects of phthalimide derivatives on the Y and Bolivia strains of *Trypanosoma*

cruzi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 86, suppl. I: 234, 1991.

Alcina, A & Fresno, M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of mouse cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Imm.** 9: 175-86, 1987.

Andrade, A.L.S.; Zicker, F.; Oliveira, R.M.; Silva, S.A.; Luquetti, A.; Travassos, L.R.; Almeida, I.C.; Andrade, S.S.; Andrade, J.G.; Martinelli, C.M.T. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet** 348: 1407-13, 1996.

Andrade, O.L.; Machado, C.R.S.; Chiari, E.; Pena, S.D.J.; Macedo, A. M.M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol. Biochem. Parasitol.** 100: 163-72, 1999.

Andrade S.G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in some types. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, vol. 18, 140-1, 1976.

Andrade S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 18, suppl. 39-46, 1985.

Andrade S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* of the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 85 (1): 17-27, 1990.

Andrade, S.G.; Carvalho, M.L.; Figueira, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Bahia**, vol 70, 32-42, 1970.

Andrade, S.G.; Carneiro Filho, A.; Souza, A.J.M.; Lima, E.S.; Andrade, Z.A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Path.** 78: 391-9, 1997.

Andrade, S.G.; Figueira, R.M.; Carvalho, M.L.; Gorini, D.F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica experimental pelo Bay 2502 (Resultados à longo prazo). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, vol. 17. 380-9, 1975.

Andrade, S.G. & Macedo, V. Tratamento combinado da doença de Chagas com Bayer 2502 e corticóide. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, vol. 15 (6): 421-30, 1973.

Andrade, S.G.; Magalhães, J.B.; Pontes, A.L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull. World Health Organization** 63: 721-6, 1985b.

Andrade, S.G.; Rassi, A.; Magalhães, J.B.; Ferriolli Filho, F.; Luquetti, A.O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Trop. Med. Hyg.** 86: 624-6, 1992.

Andrade, S.G.; Silva, R.C.; Santiago, C.M.G. Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice with MK-436, a 2-substituted 5-nitroimidazole. **Bull. World Health Organization**. 67:509-14, 1989.

Andrade, V., Andrade, S.G., Barral Netto, M.; Pontes, A. L., Castro, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 18: 143-54, 1985a.

Andrade, Z.A. & Brener, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, vol. 11. 222-8, 1969.

Antoni, F.; Hrabák, A.; Csuka, T. Effect of emetine and chloroquine on phagocytic processes of rat macrophages. **Biochem. Pharmacol.** 35: 2869-74, 1986.

Ávila, J.L. & Ávila, A. Allopurinol in the treatment of experimental acute Chagas' disease. **Curr. Chemoth. Infect. Dis.**, vol. 2, 1121-3, 1980.

Ávila, J.L. & Ávila, A. *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. **Exp. Parasitol.** 51: 204-8, 1981.

Ávila, J.L.; Polegre, M.A.; Robins, R.K. Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies in vitro and in vivo. **Comp. Biochem. Physiol.**, vol. 86 (1): 49-54, 1987.

Barioglio, S.R.; Lacuara, J.L.; Oliva, P.P. Effects of clomipramine upon motility of *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, vol. 73 (2): 451-2, 1987.

Barrett, T.V.; Hoff, R.H.; Mott, K.E.; Miles, M.A.; Godfrey, D.G.; Teixeira, R.; Almeida de Souza, J.A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 74: 84-9, 1980.

Barret, P.A.; Beveridge, E.; Bull, D.; Caldwell, I.C.; Islip, P.J.; Neal, R.A.; Woods, N.C. The efficacy of a novel compound, (E)-1-(4'-bromo-4-biphenyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-dimethylaminoprop-1-ene against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Experientia**, vol. 38, 338-9, 1982.

Belda Neto, F.M. & Ribeiro, R.D. Estudo da morfologia das formas sangüícolas de subamostras do *Trypanosoma cruzi*, após passagem em cultura e triatomíneo. **Rev. Ciên. Farm. São Paulo**, vol.10, 87-100, 1988.

Belda Neto, F.M. & Ribeiro, R.D. Estudo das características da infecção de camundongos por subamostras do *Trypanosoma cruzi*, após passagem em cultura e em triatomíneo. **Rev. Ciên. Farm. São Paulo**, vol.11, 1-13, 1989.

Bice, D.E. and Zeledón, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). **J. Parasitol.** 56: 663-70, 1970.

Boullon, F.; Sinagra, A.; Riarte, A.; Lauricella, M; Barra, J.; Besanson, M; Lejour, C.; Lopez Blanco, O.; Favalaro, R. Experimental cardiac transplantation and chronic Chagas disease in dogs. **Transp. Proc.** 20: 423-37, 1988.

Braun, M. and Titto, E. Imune response to *Trypanosoma cruzi*. Na approach to the pathogenesis of the Chagas disease. **Acta Physiol. Pharmacol. Lat. Am.** 35: 1-48, 1985.

Brener, Z. Therapeutic activity na criterion of cure on mice experimentallt infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, vol. 4, 389-96, 1962.

Brener, Z & Chiari, E. Variações morfológicas observadas e, diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, vol. 5, 220-4, 1963.

Brener, Z. Chemotherapeutic studies in tissue culture infected with *Trypanosoma cruzi*: the mode of action of some active compounds. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, vol. 60, 445-51, 1966.

Brener, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, vol. 63 (2): 215-20, 1969.

Brener, Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*. Two types of parasite populations presenting distinct characteristics. Washington, D.C., **American Health Organization** (PAHO – Scient Publ., 347) 11-21, 1977.

Brener, Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas's disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, suppl. vol. 79: 149-55, 1984.

Calabrese, K.S. Immunosuppressive drugs as a tool to explore immunopathology in experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 94, suppl.I: 273-6, 1999.

Camargo, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, vol. 6, 93-100, 1964.

Camargos, E.R.S.; Franco, D.J.; Garcia, C.M.M.G.; Dutra, A.P.; Teixeira Júnior, A.L.; Chiari, E.; Machado C.R.S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 62(5): 604-12, 2000.

Castro, M.A.P. & Brener, Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 18(4): 223-9, 1985.

Castro, S.L.; Soeiro, M.N.C.; Meirelles, M.N.L. *Trypanosoma cruzi*: effect of phenothiazines on the parasite and its interaction with host cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 87 (2): 209-15, 1992.

Castro, S.L. The challenge of chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica** 53: 83-98, 1993.

Chabala, J.C.; Waits, V.B.; Ikeker, T.; Patchett, A.A.; Payne, L.; Peterson, L.H.; Reamer, R.A.; Hoogsteen, K.; Wyvratt, M.; Hanson, W.L.; Fisher, M.H. 1-(Substituted)benzyl-5-aminoimidazole-4-carboxamides are potent orally active inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in mice. **Experientia**, vol. 47, 51-3, 1991.

Chagas, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etilógico de uma nova entidade mórbida para o homem. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, vol. 1, 159-218, 1909.

Chandrasekar, B.; Melby, P.C.; Troyer, D.A.; Colston, J.T.; Freeman, G.L. Temporal expression of proinflammatory cytokines and inducible Nitric Oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.** 152: 925-34, 1998.

Chandrasekar, B.; Melby, P.C.; Troyer, D.A.; Freeman, G.L. Differential regulation of Nitric Oxide synthase isoforms in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Clin. Exp. Imm.** 121: 112-9, 2000.

Chiari, E.; Dias, J.C.P.; Lana, M.; Chiari, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 22(1): 19-23, 1989.

Christen, R.; Agosin, M.; Jarpa, A.; Atias, A.V. Ensayos de quimioterapia em la enfermedad de Chagas experimental. VI. Acción sinérgica de la quinina com el fosfato de pentaquina. **Bol. Infec. Parasitol. Chile**, vol. 6, 23-4, 1951.

Conti, R.; Rita, R.M.; Souza, E.M.; Melo, P.S.; Haum, M.; Castro, S.L.; Duran, N. In vitro trypanocidal activities of a novel series of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives. **Microbiol.** Vol.85 (343): 83-7, 1996.

Coura, J.R. Perspectivas actuales del tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. **Bol. Chil. Parasitol.**, 51:69-73, 1996.

Croft, S.L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 94(2): 215-20, 1999.

Cruz, F.S.; Marr, J.J.; Berens, R.L. Prevention of transfusion-induced Chagas' disease by amphoterecin-B. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 29 (5): 761-5, 1980.

Cruz, M.Q.; Bräscher, H.M.; vargens, J.R.; Oliveira, A.L. Effect of actionomycin D on *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, vol. 47, 89-92, 1991.

Dias, J.C.P. & Coura, J.R. Epidemiologia. In: **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um manual prático para o Clínico Geral** (J.C.P. Dias & J.R. Coura, org.), p.33-66, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 1997.

Diego, J.A.; Penin, P.; Rey, J.; Mayer, R.; Gamalho, C. A comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in as experimental model. **Histol. Histopath.** 6: 199-206, 1991.

Doyle, P.S. & Weinbach, E.C. The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, vol. 68, 230-4, 1989.

Ebert, D. & Herre, E.A. The evolution of parasitic disease. **Parasitol. Today**, vol.12 (3): 96-101, 1996.

Engel, J.C.; Doyle, P.S.; Hsieh, I.; Mckerrow, J.H. Cysteine protease inhibitors cure na experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** vol. 188, (4): 725-34, 1998.

Evans, T.G.; Reed, S.S.; Hibbis, J.R. Nitric Oxide production in murine *Leishmaniasis*: correlation of progressive infection with increase in systemic synthesis of Nitric Oxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54: 486-9, 1996.

Fairlamb, A.H. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 84: 613-7, 1990.

Fernandes O.; Mangia, R.H.; Lisboa, C.V.; Pinho, A.P.; Morel, C.M.; Zingales, B.; Campbell D.; Jansen, A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Rio de Janeiro State (Brazil) revealed by the non-transcribe spacer of the min-exon gene. **Parasitol.** 118: 161-8, 1998.

Ferriolli Filho, F. Estudo da morfologia e do comportamento em camundongos de amostras do *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909, mantidas em laboratório son quatro modos diferentes. Universidade Estadual de Ribeirão Preto – USP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. **Tese Livre Docência**, 1975.

Filardi, L.S. and Brener, Z. Nitroimidazole-thiadizole derivate with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** (76):293-97, 1982.

Filardi, L.S. and Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** (81): 755-9, 1987.

Funayama, G.K. & Prado Júnior, J.C. Estudos dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 8, 75-81, 1974.

Gallerano, R.H.; Marr, J.J.; Sosa, R.R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patents with chronic Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** vol. 43 (2): 159-66, 1990.

Garcia, S.B.; Paula, J.S.; Giovannetti, G.S.; Zenha, F.; Ramalho, E.M.; Zucoloto, S.; Silva, J.S.; Cunha, F.Q. Nitric Oxide is involved in the lesions of the Peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.** (93): 191-7, 1999.

Garmaise, D.L. 1,2,3,4-tetrahydro-5H-pyrido[4,3-b] indoles and the corresponding 1,2,3,4-tetrahydro-9H-pyrido[3,4-b] indoles and their derivates for use against *Trypanosoma cruzi*. Patente: U.S. 3,652,574. In: **Chem. Abstr.**, 77 (4): 34481, 1972.

Gately, M.K.; Mulqueen, M.J. Interleukin 12: potetial clinical applications in the treatment and prevention of infeccious disease. **Drugs.** 52: 18-26, 1996.

Gazzinelli, R.T.; Oswald., J.P.; Hienys, S.; James, S.L.; Sher, A. The microbicidal activity of IFN- γ treated macrophages against *T. cruzi* involves na L-arginine-dependent nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitabile by IL-10 and TGF- β . **Eur. J. Imm.** 22: 2501-6, 1992.

Giovanni-De-Simone, S.; Carvalho, L.C.P.; Oliva, O.F.P.; Andrade, S.G.; Castro-Galvão, B. *Trypanosoma cruzi* strain-especific monoclonal antibodies: identification of Colombian strain flagellates in the insect vector. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** (81): 750-4, 1987.

Goad, L.J; Berens, R.L.; Marr, J.J.; Beach, D.H.; Holz Júnior, G.G. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. **Mol. Biochem. Parasitol.** Vol. 32, 179-90, 1989.

Golden, J.M. & Tarleton, R.L. *Trypanosoma cruzi*: CitoKine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.** (72): 391-402, 1991.

Gorla, N.B.; Ledesma, O.S.; Barbieri, G.P.; Larripa, I.B. Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutat. Res.* Vol. 206, 217-20, 1988.

Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glodows, K.; Skepper, P.L.; Weshnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* (126): 131, 1982.

Hrabák, A.; Sefrioui, H.; Vercruysse, V.; Temesi, A.; Bajor, T.; Vray, B. Action of Chloroquine on Nitric Oxide production and parasite killing by macrophages. *Eur. J. Pharm.* (354): 83-90, 1998.

Hulsebos, L.H. The effect of interleukin-2 on parasitaemia and myocarditis in experimental Chagas' disease. *J. Protozool.*, vol. 36 (3): 293-8, 1989.

Iensch, H. Neue Chemotherapeutika der 4-aminochinolin Reihe. *Ang. Chemie.*, vol. 50, 891-5, 1937.

Ingleessis, T.; Carrasco, H.A.; Anez, N.; Fuenmayor, C.; Parada, H.; Pacheco, J.A.; Carrasco, H.R. Clinical, parasitological and histopathologic follow-up studies of acute Chagas patients treated with benznidazole. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, 68(5): 405-10, 1998.

James, S.L. Role of Nitric Oxide in parasitic infections. *Microb. Rev.* (59): 533-47, 1995.

Jansen, A.M.; Pinho, A.P.S.; Lisboa, C.V.; Cupolillo, E.; Mangia, R.H.; Fernandes, O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 94, suppl. I: 203-4, 1999.

Kelly, R.A.; Balligand, J.L.; Smith, T. Nitric Oxide and cardiac function. *Circ. Res.* (79): 363-80, 1996.

Kierszenbaum, F. Chronic Chagasic tissue lesions in the absence of *Trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. **Parasitol. Today**, vol.12 (11): 414-15, 1996.

Kress, Y.; Bloom, B.R.; Wittner, M.; Rowen, A.; Tonowitz, H. Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. **Nature**, vol. 257, 394-6, 1975.

Lane, J.E.; Ribeiro, R.R.; Suarez, C.C.; Bogitsh, B.J.; Jones, M.M.; Singh, P.K.; Carter, C.E. In vitro trypanocidal activity of tetrathylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 55 (3): 263-6, 1996.

Levi, G.C.; Lobo, I.M.F.; Kallás, E.G.; Amato Neto, V. Etiological drug treatment of human infection by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 38 (1): 35-8, 1996.

Liew, F.Y.; Moss, D.; Parkinson, C.; Rogers, M.V.; Moncada, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with induction of Nitric Oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Imm.** (21): 3009-14, 1991.

Lima, D.R. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, p. 1015, 1995.

Lima, V.S.; Mangia, R.H.R., Carreira, J.C.; Marchewski, R.S.; Jansen, A.M. *Trypanosoma cruzi*: correlations of biological aspects of the life cycle in mice and Triatomines. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 94 (3): 397-402, 1999.

Lopes, J.N.C. Síntese de substância com atividade praguicida: derivados de 2-amido-1,3 e 1,4-dicetonas e ésteres da N-hidroximetilftalimida. Universidade Estadual de São Paulo – USP – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. **Tese de Doutorado**, 1975.

Lopes, J.N.C.; Nasi, A.M.T.T.; Barros, D.A.D.; Bulhões, M.S. Molluscidial activity of synthetic derivatives of 2-hydroxyethylphthalimide. **Rev. Brasil. Biol.**, vol. 40 (3): 635-7, 1980.

Lopes, L.; Samar, Y.; Solovey, M.M.; Korolkovas, A. Ensaios biológicos de novos derivados do ácido 3-fofonopropiônico contra o *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Farmac. Bioquim. Univ. São Paulo**, vol. 26 (1): 53-64, 1990.

Luban, N.A. & Dvorak, J.A. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. **Exp. Parasitol.** 36: 143-9, 1974.

Luz, Z.M.P.; Coutinho, M.G.; Cançado, J.R.; Krettli, A.U. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 27(3): 143-8, 1994.

McCabe, R.E.; Remington, J.S.; Araujo, F.G. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. **J. Infect. Disease**, vol. 150 (4), 594-601, 1984.

McCarthy, M. Drug eradicates Chagas' parasite in mice. **Science and Medicine**, vol.348, (24): 534, 1996.

Martinez-Dias, R.A.; Escario, J.A.; Nogal-Ruiz, J.J.; Gomez-Barrio, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 96(1): 53-9, 2001.

Martins, G.A.; Cardoso, M.A.G.; Aliberti, J.C.S.; Silva, J.S. Nitric Oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infections in mice. **Imm. Letters** (63): 113-20, 1998.

Mattei, D.M.; Goldenberg, S.; Morel, C.; Azevedo, H.P.; Roitman, I. Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonuclear cleavage of kinoplast-DNA. **FEBS Letters**, vol. 74, 264-8, 1977.

Maya, J.A.; Repetto, Y.; Agosín, M.; Ojeda, J.M.; Tellez, R.; Gaule, C., Morello, A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.** (86): 101-6, 1997.

Melo, R.C. & Brener, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, vol. 64, 475-82, 1978

Miles, M.A.; Lanhan, S.M.; Souza, A.A.; Pova, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** (74): 221-37, 1980.

Miyachi, H.; Azuma, A.; Hashimoto, Y. Novel biological response modifiers: phthalimides with TNF- α production regulating activity. **Yakugaku Zasshi**, vol.117 (2): 91-107, 1997.

Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology of Nitric Oxide. **Pharmac. Rev.** (43): 109-242, 1991.

Murray, P.K.; Habbersett, M.C.; Meurer, R.D. *Trypanosoma cruzi*: efficacy of the 2-substituted, 5-nitroimidazoles, MK-436 and L634,549, in tissue culture and mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 32 (6): 1242-50, 1983.

Murray, H.W.; Spitalny, G.L.; Nathan, C.T. Activation of mouse peritoneal macrophages in vivo and in vitro by interferon- γ . **J. Imm.** (146): 3591-8, 1985.

Nasi, A.M.T.T. N-alkil-, N-aril- e N-(aril)aminometilftalimidas. Síntese, caracterização e ensaios biológicos. Universidade de São Paulo – USP .Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. **Tese Livre Docência**, 1989.

Nathan, C.; Nogueira, N.; Juangbhanich, C.; Ellis, J.; Cohn, Z. Activation of macrofages in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *T. cruzi*. **J. Exp. Med.** (149): 1056-68, 1979.

Nogeira, N.; Ellis, J.; Chaplan, S.; Cohn, Z. *Trypanosoma cruzi*: In vivo and In vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** (51): 325-34, 1981.

Norris, K.A.; Schrimpf, J.E.; Flynn, J.L.; Morris Júnior, S.M. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental Arginine and Citrulline augment Nitric Oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Imm.** 2793-6, 1995.

Oliveira, L.C.; Borges, M.M.; Leal, R.C.; Assreuy, J.; Kloetzel, J.K. Nitric Oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Calomys callosus and Swiss mice. **Parasitol. Res.** (83): 762-70, 1997.

Orithel, T.C. & Ash, L.R. *Trypanosma cruzi*. **Parasites in Human Tissues**. American Society of Clinical Pathologists p.60-3, 1995.

Pakianathan, D.R.; Kuhn, R.E. *Tryapanosoma cruzi* affects Nitric Oxide production by murine peritoneal macrophages. **J. Parasitol.** 80(3): 432-7, 1994.

Penin, P.; Gamalho, C.; Diego, J.A. Biological comparison between three clones of *Trypanosoma cruzi* and the strain of origin (Bolivia) with reference to clonal evolution studies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 91(3): 285-91, 1996.

Pereira, L.H.S. & Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, vol. 20 (3): 191-208, 1953.

Petray, P.; Rottenberg, M.E.; Grinstein, S.; Örn, A. Release of Nitric Oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Imm.** (16): 193-9, 1994.

Petray, P.; Velez-Castaños, E.; Grinstein, S.; Örn, A.; Rottenberg, M.E. Role of Nitric Oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Imm. Letters** (47): 121-6, 1995.

Petry, K & Eisen, H. Chagas Disease: a model for the study of autoimmune diseases. **Parasitol. Today**, vol. 5 (4): 111-6, 1989.

Plata, F.; Wileterbin, J.; Ons, F.G.; Falcoff, E.; Eisen, H. Synergistic protection by specific antibodies and IFN against infection by *T. cruzi* in vitro. **Eur. J. Imm.** (14): 930-5, 1984.

Polak, A. & Richle, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, vol. 72 (1): 45-54, 1978.

Postan, M.; Bailey, J.J.; Dvorak, J.A.; McDaniel, J.P.; Pottala, E.W. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (37): 541-9, 1987.

Ramirez, L.E.; Lages-Silva, E.; Pianetti, G.M.; Rabelo, R.M.; Bordin, J.O.; Moraes-Souza, H. Prevention of transfusion-associated Chagas's disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi* infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. **Transfusion** 35(3): 226-30, 1995.

Rassi, A.; Amato Neto, V.; Siqueira, A.F.; Ferriolli Filho, F.; Amato, V.S.; Rassi Júnior, A. Efeito protetor do benzonidazol contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente

infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóide em vitude de afecções associadas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 32 (5): 475-82, 1999.

Rassi, A.; Amato Neto, V.; Siqueira, A.F.; Leite, M.S.B. Efeito protetor do nifurtimox contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóide em vitude de afecções associadas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** (31): 249-55, 1998.

Ribeiro, R.D.; Lopes, R.A.; Carmo, T.A.; Garcia, T.A.R. Índice de cura de camundongos tratados com nifurtimox e benzonidazol na doença de Chagas experimental. **Rev. Ciên. Farm.**, São Paulo, vol. 10, 71-6, 1988a.

Ribeiro, R.D.; Lopes, R.A.; Garcia, T.A.R. Histopathological study of the mamary gland in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Parasitol. Res.** (74): 290-2, 1988b.

Ribeiro, R.D.; Ferriolli Filho, F.; Belda Neto, F.M. Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. **Rev. Brasil. Biol.** 42(1): 51-4, 1982.

Ribeiro, R.D.; Belda Neto, F.M.; Prado Júnior, J.C. Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em reações de aglutinação. **Rev. Facul. Odont. Ribeirão Preto**, vol. 23 (2): 208-12, 1986.

Ruiz, R.C.; Favoreto Júnior, S.; Dorta, M.L.; Oshiro, M.E.M.; Ferreira A.T.; Manque, P.M.; Yoshida, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signalling activity. **Biochem. J.** (330): 505-11, 1998.

Salvemini, J.M.; Mollace, V. Roles and therapeutic implications of nitric oxide in the cardiovascular system. **DN&P**, 7: 158-66, 1994.

Schmidt, H.H.H.W. & Walter U. NO at work. **Cell**, vol. 79 (23): 919-25, 1994.

Schmunis, G.A. Tripanossomiase Americana: Seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. **In: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas**. Um manual prático para o Clínico Geral (J.C.P. Dias & J.R. Coura, eds.), p.11-24, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 1997.

Shibata, Y.; Sasaki, K.; Hashimoto, Y.; Iwasaki, S. Phenylphthalimides with tumor necrosis factor alpha production-enhancing activity. **Chem. Pharm. Bull.** (Tokyo), vol. 44 (1):156-62, 1996.

Sims, P. & Gutteridge, W.E. Effect of a 5-nitrofuran drug (SQ 18506) on *Trypanosoma cruzi*. **IRCS Med. Sci.**, vol. 6 (7): 299, 1978.

Siqueira, A.F.; Ribeiro, R.D.; Fernandes, L.A.R. Reações de aglutinação e as relações antigênicas das cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, vol. 15 (2): 76-80, 1973.

Siqueira-Batista, R.; Corrêa, A.D.; Huggins, D.W. **Moléstia de Chagas**, Editora Cultura Médica, 1996.

Slater, A.F. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacol. Ther.** (57): 203-35, 1993.

Stoppani, A.O. Chemotherapy of Chagas disease. **Medicina**, Buenos Aires 59, suppl. 2: 147-65, 1999.

Sogayar, R.; Kipnis, T.L.; Curi, P.R. A critical evaluation of the expression of parasitaemia in experimental Chagas disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 35 (5): 395-8, 1993.

Sousa, M.A. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other Trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 94, suppl. I : 205-10, 1999.

Souto, R.P.; Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Campbell, D.A.; Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.** (83): 141-52, 1996.

Souza, H.M. Quimioprofilaxia do Doença de Chagas Transfusional – Realidade atual. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** (22): 1-3, 1989.

Souza, W. O parasita e as relações hospedeiro-parasita. In: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 88-126, 2000.

Taletón, R.L. & Zhang, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol. Today**, vol. 15 (3): 94-8, 1999.

Theis, J.H.; Tibayrenc, M.; Mason, D.T.; Ault, S.K. Exotic stock of *Trypanosoma cruzi* capable of development in and transmission by *Triatoma protracta* from California: public health implications. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (36): 523-8, 1987.

Thompson, P.E.; Bayles, A.; Olszewski, B. PAM 1392 [2,4-diamino-6-(3,4-dichlorobenzylamino)quinazoline] as a chemotherapeutic agent: *Plasmodium berghei*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi*, and *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, vol. 25, 32-7, 1969.

Thomson, L.; Gadilha, F.R.; Peluffo, G.; Vercesi, A.E.; Radi, R. Peroxynitrite affects Ca^{2+} transpot in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.** (98): 81-91, 1999.

Toledo, M.J.; Guilherme, A.L.; Silva, J.C.; Gasperi, M.V.; Mendes, A.P.; Gomes, M.L.; Araujo, S.M. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 39 (5): 283-90, 1997.

Truyens, C.; Torrico, F.; Angelo-Barrios, A.; Lucas, R.; Heremans, H.; De Baeselier, P.; Carlier, Y. The cachexia with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. **Parasite Immunol.**, 17(11): 561-8, 1995.

Urbina, J.A.; Payares, G.; Molina, J.; Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazard, K.; Piras, M.M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Ryley, J.F. Cure of short and long-term experimental Chagas Disease using D0870. **Science** (273): 969-71, 1996.

Urbina, J.A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 94, suppl. I: 349-55, 1999.

Varma, R.S. Potential biologically active agents. IV. Synthesis of N-substituted phthalimides. **J. Indian. Chem. Soc.**, vol. 50 (7): 495-7, 1974.

Vespa, G.N.; Cunha, F.Q.; Silva, J.S. Nitric Oxide involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitaemia a directly kills the parasite in vitro. **Infec. Imm.** 62: 5177-82, 1994.

Vinhaes, M.C. & Dias, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, suppl. (2) 16:12-7, 2000.

Zhu, X.; Ertel, W.; ayala, A.; Morrison, M.H.; Perrin, M.M.; Chaudry, I.H. Chloroquine inhibits macrophage tumour necrosis factor- α mRNA transcription. **Immunology** (80): 122-6, 1993.

Zingales, B.; Souto, R.P.; Mangia, R.H.; Lisboa, C.V.; Campbell, D.A.; Coura, J.R.; Jansen, A.M.; Fernandes, O.; Molecular epidemiology of american trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Inter. J. Parasitol.** (28): 105-12, 1998.

Zingales, B. Revisting *Trypanosoma cruzi*: the meaning of the two major groups, two species of the same parasites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 95, suppl II, 10-2, 2000.

Yoshida, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Imm.** 836-9, 1983.

Winstead, M.B. & Heine, H.W. Identification of amines. I. N-(arylaminomethyl)-phthalimides. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 77, 1913-4, 1955.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series 811. Geneva: **WHO**, 1991.

WHO – Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Meeting on development of trypanocidal compounds for sterilization of blood. Geneva, **WHO** 13-4, 1984.
