



LABORATÓRIO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE
ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Alexander Silva de Melo

IDENTIFICAÇÃO DAS FUNÇÕES DA CRUZIPAÍNA NO CICLO VITAL DO
TRYPANOSSOMA CRUZI

Rio de Janeiro
2011

Alexander Silva de Melo

IDENTIFICAÇÃO DAS FUNÇÕES DA CRUZIPAÍNA NO CICLO
VITAL DO TRYPANOSSOMA CRUZI

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada a Escola Politécnica de
Saúde Joaquim Venâncio como requisito
parcial para a aprovação no curso de
Vigilância em Saúde.

Orientador: Ray Luiza Soares Salgado
Müller

Rio de Janeiro
2011

Alexander Silva de Melo

IDENTIFICAÇÃO DAS FUNÇÕES DA CRUZIPAÍNA NO CICLO VITAL DO
TRYPANOSSOMA CRUZI

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada a Escola Politécnica de
Saúde Joaquim Venâncio como requisito
parcial para a aprovação no curso de
Vigilância em Saúde.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Ray Luiza Soares Salgado Müller – EPSJV

Daniel Santos Souza – EPSJV

Emanuele Amorim Alves – EPSJV

*Dedico este trabalho
primeiramente à Deus;
à minha vó;
aos meus pais, Elinete e José;
à minha irmã;
à todos os amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que em todo tempo tem me presenteado com força e paciência.

Agradeço também à minha orientadora, Ray Luiza, que durante esse ano tem me apoiado e me ajudado a seguir com o trabalho. Sempre com paciência e carinho, ela me guiou e me mostrou de maneira eficiente os melhores caminhos a seguir até a conclusão do projeto.. Além dela, tenho também os professores Daniel Souza e Flávio Paixão, que sempre demonstraram grande paixão pelo que fazem, e em todo o tempo se disponibilizaram à me ajudar. Sempre dando seu melhor, os três despertaram em mim o interesse pelo tema deste trabalho, além de despertar também um interesse pessoal pela área em que atuam.

Tenho muito à agradecer também aos meus pais e à minha irmã, que em cada momento demonstraram fé em mim me dando forças para seguir em frente, em direção daquilo que eu quisesse conquistar. Foram eles, antes de mais ninguém, minhas maiores inspirações, e são eles até hoje meus mais fiéis investidores.

Tenho muito a agradecer aos amigos, especialmente da EPSJV que tornaram cada dia de convivência mais fácil e mais agradável. Esses carregaram comigo um fardo realmente pesado, mas que valia a pena simplesmente pelo fato de estarem ao meu lado. Me faltam palavras para expressar a grande gratidão que eles conquistaram de mim. À esses lindos deixo o mais profundo afeto, os mais belos sentimentos, a mais sincera amizade e as mais perfeitas lembranças. Entre eles agradeço especialmente à Isabella, Gabriel, Yuri, Ana Carolina, Jonathas, Samuel, Isabel (Meu esquilo), Adriene, Micheline (Minha pretinha), Amós, Abner, Laís, Karolline e Andressa.

A essas pessoas dedico meu trabalho. A elas que fizeram cada minuto valer a pena, e que me proporcionaram a força que muitas vezes me faltou, e que foi suficiente para chegar onde cheguei. A elas, que com seu trabalho, me ajudaram a dar meu melhor, ou pelo menos, boa parte disso, deixo meu eterno e grato obrigado.

RESUMO

A tripanosomíase americana é uma moléstia que tem representado grandes preocupações governamentais, além de ser um indicador claro de algumas implicações sócio-econômicas pertinentes na América Latina. Além disso, a moléstia determina nas vítimas infectadas um quadro clínico caracterizado por graves anomalias nos órgãos cavitários (coração, intestino, esôfago). Devido a sua gravidade e às complicações que esta oferece aos cidadãos infectados, é urgente a descoberta de drogas e tratamentos úteis para o tratamento da doença. Para o desenvolvimento de novos fármacos eficientes contra o *T. cruzi*, é necessário antes de mais nada a escolha de uma via metabólica característica deste protozoário que sirva como alvo para estes fármacos. A cruzipaina é um exemplo de enzima indispensável para a sobrevivência do parasito, e por esse motivo tem sido meticulosamente estudada por diversos pesquisadores que buscam de forma eficiente desenvolver inibidores específicos que simbolizem a possibilidade de erradicação da doença, ou ao menos a possibilidade de novos tratamentos que garantam à população infectada uma esperança de cura. Sendo a cisteína protease mais abundante no *T. cruzi* a inibição da cruzipaina significa impedir a realização das funções vitais do parasito, ou seja, um tratamento desenvolvido a partir dessa enzima abre novos horizontes no que se diz respeito à cura da tripanosomíase americana.

Palavras-Chave: Mal de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Cisteína protease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Trypanossoma cruzi</i>	10
Figura 2	Barbeiro em diversas fases do seu ciclo vital.....	11
Figura 3	Ciclo vital do <i>T. cruzi</i>	12
Figura 4.a	Tripomastigota metacíclico.....	13
Figura 4.b	Tripomastigota sanguícola.....	13
Figura 5.a	Amastigota.....	13
Figura 5.b	Epimastigota.....	13
Figura 6	Estrutura cristalográfica da cruzipáina.....	14
Figura 7	Foto de Berenice em manchete de jornal.....	17
Figura 8	Casa de pau-a-pique.....	19
Figura 9	Estruturas intracelulares do <i>T. cruzi</i>	22
Figura 10	Fórmula estrutural do nifurtimox.....	25
Figura 11	Fórmula estrutural do benzonidazol.....	25
Figura 12	Representação do alinhamento dos inibidores de cruzipáina.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.3 JUSTIFICATIVA.....	15
1.4 METODOLOGIA.....	15
2 CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA	16
3 SISTEMÁTICA: GÊNERO TRYPANOSSOMA	21
4 CISTEÍNO PROTEASE: A CRUZIPAÍNA	24
4.1 FUNÇÕES DA CRUZIPAÍNA NO TRYPANOSSOMA CRUZI.....	24
4.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	25
5 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA CRUZIPAÍNA	30
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas em diferentes regiões geográficas do planeta e representam uma crescente ameaça mundial. Elas são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população de vários países em desenvolvimento, especialmente do continente africano e na América do Sul (DIAS *et al.* 2009).

Um exemplo dessas doenças é a tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas é uma zoonose ¹ típica das Américas, e se estende desde o sul dos Estados Unidos até o Chile, tendo forte incidência no Brasil. É causada por um protozoário flagelado ,o *Trypanossoma cruzi* (Figura 1).

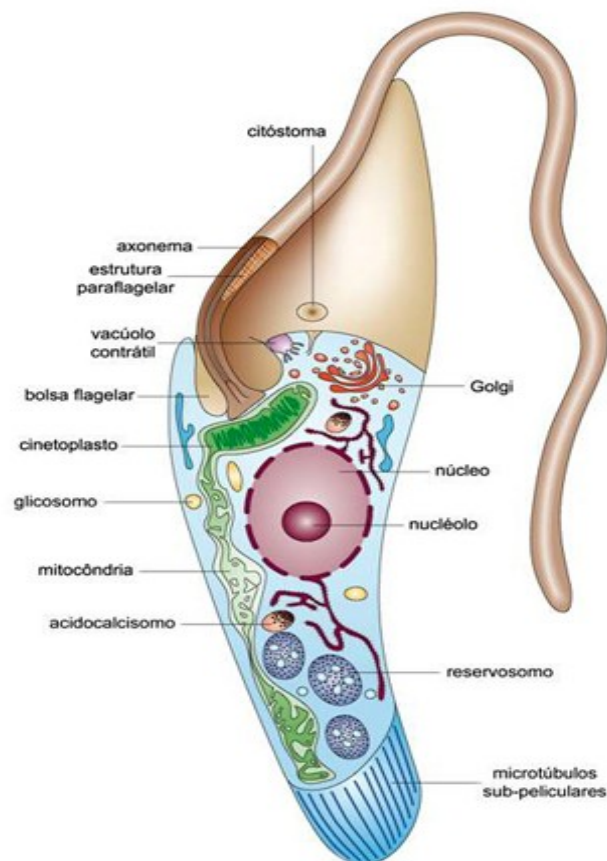


Figura 1: *Trypanossoma cruzi* e suas estruturas intracelulares.

Fonte: FUGESP, 2007.

O protozoário passa parte da vida parasitando um hospedeiro invertebrado hematófago, e é transmitido ao hospedeiro vertebrado a partir da picada deste primeiro hospedeiro, um inseto integrante do grupo dos triatomíneos conhecidos popularmente como

¹ São doenças de animais transmissíveis ao homem, bem como aquelas transmitidas do homem para os animais.

barbeiros (Figura 2) ou chupões. Estes insetos são típicos das regiões rurais, onde se encontra uma grande parcela da população suscetível à contaminação.

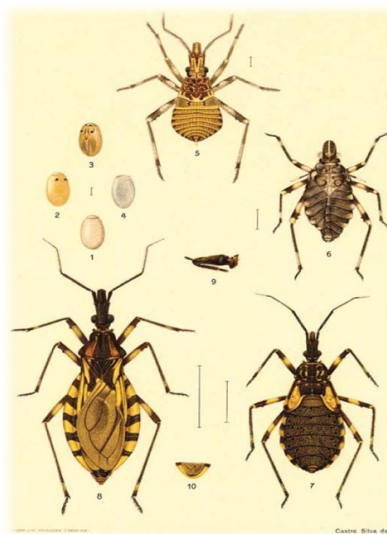


Figura 2: Barbeiro (Inseto hematófago), em diversas fases do seu ciclo vital.

Fonte: SERESVIVOSDORN, 2005.

Tal enfermidade determina no homem um quadro clínico com sintomatologia muito variada. Entre os sintomas mais preocupantes podemos citar a cardiopatia chagásica e as dilatações dos órgãos cavitários (megaesôfago, megacólon, etc.), características do aparelho digestivo. Entretanto, nem todos os indivíduos contaminados apresentam o quadro clínico descrito anteriormente. Alguns podem desenvolver tais lesões graves e progressivas, enquanto outros podem ser portadores assintomáticos da doença durante toda a vida (REY, 2002).

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda, que dura em média dois meses, sucedida da fase crônica que se prolonga por toda a vida do hospedeiro vertebrado (DIAS *et al.* 2009). Atualmente não são conhecidos muitos tratamentos preventivos eficientes (Além da profilaxia que consiste em eliminar os vetores [babeiros] e evitar a construção de casas de pau-a-pique), ou curativos contra o mal de Chagas na fase crônica, havendo somente medicamentos úteis para a fase aguda.

O *Trypanossoma cruzi* apresenta um ciclo vital (Figura 3) complexo, caracterizado por duas etapas distintas: uma em que este infecta um hospedeiro invertebrado e hematófago e a outra em um hospedeiro mamífero. No decorrer desse ciclo o protozoário sofre algumas transformações e assume diferentes formas de acordo com o ambiente que se encontra buscando adaptar-se e realizar as funções características de cada fase (divisão celular, invasão

intracelular e nutrição). São quatro as formas evolutivas pelas quais o *Trypanosoma cruzi* passa: a amastigota, epimastigota, tripomastigota metacíclica e tripomastigota sanguícola.



Figura 3: Esquema do ciclo Vital do *T. cruzi*

Fonte: FLICKR, 2012.

O ciclo se inicia quando o inseto pica a pessoa e defeca ao mesmo tempo sobre a pele da mesma. A picada do inseto causa uma reação alérgica devido à saliva do triatomíneo. Ao se coçar a própria pessoa direciona as fezes do animal para a ferida aberta pela picada. Através dessa picada o parasito na forma tripomastigota metacíclica (Figura 4.a) penetra na corrente sanguínea da vítima e passa para a forma tripomastigota sanguícola (Figura 4.b). A partir daí o protozoário invade as células (tendo preferência por células da musculatura estriada) do hospedeiro humano e lá assume outra forma, a amastigota (Figura 5.a), onde se reproduz sucessivas vezes até que as células se rompam e novamente liberem no sangue o parasito na forma de tripomastigota sanguícola (REY, 2002).

Nesse estágio o *T. cruzi* pode invadir novas células voltando a assumir a forma amastigota ou pode ser ingerido por um novo inseto hematófago, quando este realiza a hematofagia. Ao ser ingerido, o parasito passa para a forma epimastigota (Figura 5.b) e se

instala no trato digestivo do inseto contaminado. Lá ele se reproduz repetidas vezes e volta a assumir a forma tripomastigota metacíclica na região posterior do intestino do inseto. O ciclo então recomeça quando o inseto pica mais um indivíduo contaminando-o com os protozoários existentes em seu intestino.

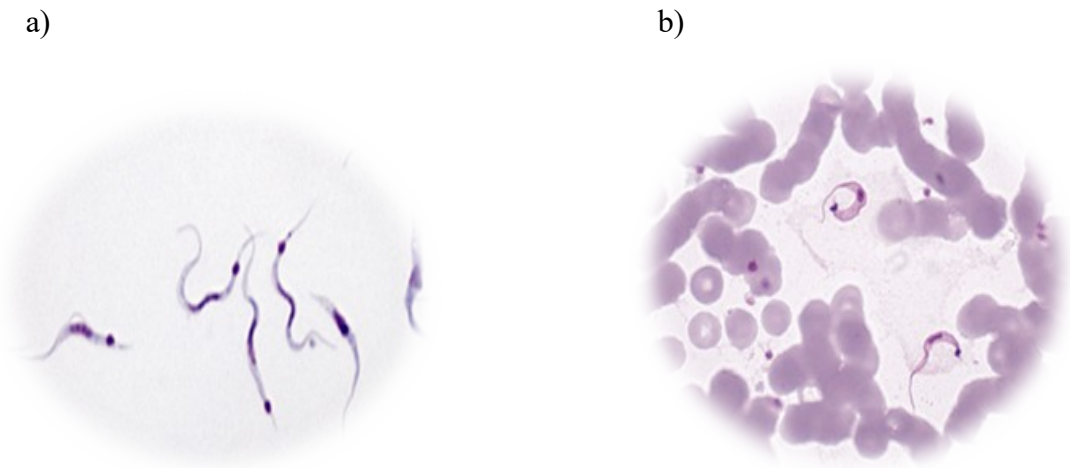


Figura 4: a) Tripomastigota Metacíclico; b) Tripomastigota Sanguícola

Fonte: FIOCRUZ, 2011.

Coloração: Hematoxilina e Eosina – HE

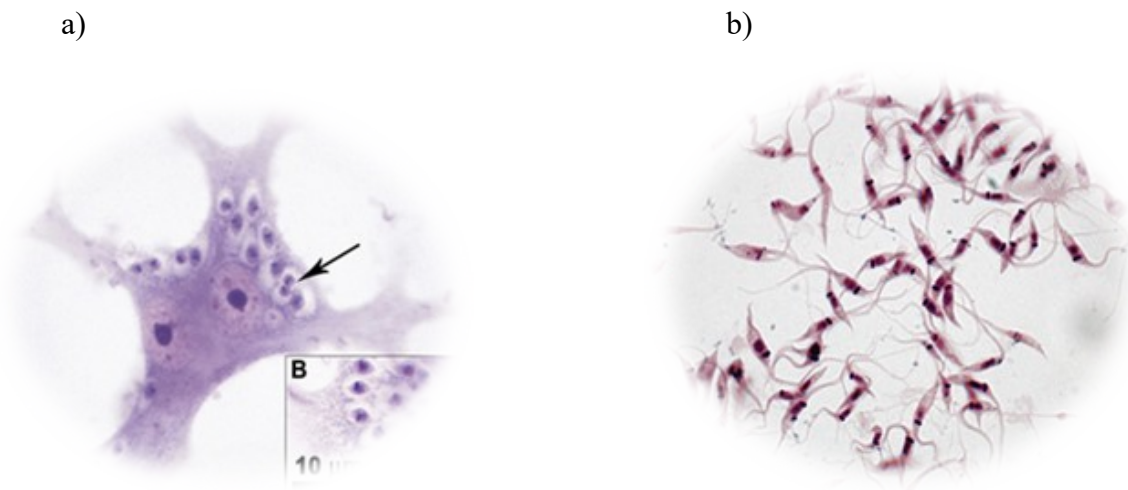


Figura 5: a) Amastigota; b) Epimastigota

Fonte: FIOCRUZ, 2011.

Coloração: Hematoxilina e Eosina – HE

Para a realização das funções necessárias dentro do ciclo vital do *T. cruzi*, o mesmo se utiliza de algumas estruturas intracelulares importantes, permitindo assim, que o parasito

encerre seu ciclo, transmitindo informações essenciais para a geração seguinte de protozoários. Uma das estruturas de maior importância para a sobrevivência do protozoário é a cruzipaina (Figura 6), uma cisteína protease ² essencial à sobrevivência do parasito (PESSÔA; MARTINS, 1977).



Figura 6: Estrutura cristalográfica da cruzipaina de *T. cruzi*.

Fonte: LUIZ DIAS, 2009.

A cruzipaina, ou cruzaina como também é chamada, é o cisteína protease de maior importância no *T. cruzi*. Está presente em todas as fases do ciclo vital do parasito, sendo liberada em diferentes compartimentos celulares em cada estágio. Além disso, também está associada às etapas de invasão celular e de resposta imune do hospedeiro; ao processo de nutrição; e à reprodução intracelular na forma amastigota (DU *apud* PÔSSA, 2008).

Uma vez que é essencial nas diversas etapas do ciclo vital do parasito a cruzaina é considerada um excelente alvo biológicos de inibidores específicos³ e irreversíveis⁴ que visam a cura e o controle da doença.

1.2 OBJETIVOS

Devido a sua importância, este trabalho tem como objetivo principal identificar as funções da cruzipaina no decorrer do ciclo vital do *Trypanosoma cruzi*. E como objetivos específicos a realização de um apanhado histórico nas pesquisas que levaram à identificação

² Cisteína protease ou proteinase é uma glicoproteína responsável pela quebra de ligações peptídicas de aminoácidos das proteínas. Também conhecida como cruzipaina, cruzaina ou GP57/51 (glicoproteína com duas bandas características com peso molecular de 57/51.000 daltons).

³ São inibidores que agem sobre uma enzima específica.

⁴ São inibidores que inativam um proteína para sempre.

da cisteína protease de *T. cruzi* e identificar os efeitos da inibição da cruzipaina tanto para o *T. Cruzi*, quanto na doença.

1.3 JUSTIFICATIVA

O principal motivo para a escolha da cruzipaina e o *T. cruzi* como objeto para este projeto é a importância médica e farmacêutica dos mesmos para a descoberta da cura ou para o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes para o tratamento da Doença de Chagas, já que a cruzipaina é um excelente alvo biológico para o desenvolvimento de inibidores específicos, o que também influenciou na escolha deste tema (DU *apud* PÔSSA, 2008)..

1.4 METODOLOGIA

Para realização do trabalho proposto foram utilizados artigos científicos que abordavam os diversos aspectos da cruzipaina. Além disso, foi realizado um levantamento bibliográfico em livros e sites que se utilizavam do mesmo tema, para melhor entendimento, o que é indispensável para o desenvolvimento do meu projeto final.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA

A tripanossomíase americana (ou doença de Chagas) é uma das doenças de maior distribuição em todo continente americano. Apesar de ser mais expressiva na América Latina, são encontrados casos da enfermidade até o sul dos Estados Unidos. Isso ocorre devido aos inúmeros vetores responsáveis pela transmissão do agente etiológico ⁵ da moléstia, sendo conhecida mais de cem espécies de insetos hematófagos responsáveis pela contaminação, presentes desde os EUA até o Chile (WHO *apud* REY, p. 139, 2002).

Deve-se entender a doença como produto das alterações produzidas pelo homem no ambiente, e das condições precárias de vida de alguns cidadãos que, devido a certas distorções econômicas se vêem inseridos no ciclo silvestre dos vetores e do agente causal do mal de Chagas, o *Trypanossoma cruzi* (VINHAES & DIAS, 2000).

Em 1908, no povoado de Lassance, Minas Gerais, o médico pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas identificou pela primeira vez uma nova espécie de protozoário flagelado pertencente ao gênero *Trypanossoma* (denominando-o *Trypanossoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz, com quem trabalhava em pesquisas sobre a malária) no trato digestivo de insetos hematófagos conhecidos no Brasil como barbeiros. Com a suspeita de que esse parasito poderia estar circulando entre os insetos e mamíferos (inclusive humanos) Chagas passou a procurá-lo em pessoas e animais da região. Para confirmar suas suspeitas, Chagas fez inocular macacos, que desenvolveram a parasitemia e uma sintomatologia febril (REY, p 128, 2002).

Coube também a Chagas, diagnosticar e estudar o primeiro caso registrado da moléstia em humanos. Em abril de 1909, Chagas, encontrou no sangue de uma menina febril, de nome Berenice, com dois anos, o mesmo protozoário encontrado nos barbeiros e animais examinados. Berenice (Figura 7) foi o primeiro caso clínico registrado da doença em hospedeiros humanos. A confirmação desse caso foi possível após contaminar animais de laboratório com parasitas do sangue da menina. Estes por sua vez, desenvolveram a infecção e a sintomatologia características da doença, confirmando as suspeitas de Chagas. Berenice desenvolveu a forma crônica da doença morrendo anos depois, já na velhice (LANA & TAFURI, 199-).

⁵ Etiologia, em biologia, trata-se de um conceito que abrange a pesquisa em torno das causas de determinada doença.



Figura 7: Foto de Berenice em manchete de jornal.

Fonte <http://www.submarino.net/cchagas/artigos/art1.htm>.

Acessado em: 29/09

Partindo de sua descoberta, pôde então, não só descrever o agente etiológico da doença e suas formas evolutivas, como também caracterizar a nova tripanossomíase, estabelecer a etiologia o ciclo parasitário, identificar os vetores, os reservatórios domésticos e silvestres, descrever a doença e seu diagnóstico, analisando assim todos os aspectos básicos de sua patologia e epidemiologia (REY, p. 128, 2002).

Abaixo, se encontra um trecho do livro “Meu Pai”, de Carlos Chagas Filho descrevendo o processo que levou seu pai a descobrir essa nova moléstia.

Consultado Oswaldo Cruz pelo governo federal, indica ele a ida a Lassance de Chagas, uma vez que possuía comprovada experiência no combate à malária, tanto em Itatinga como no Xerém. (...) segue, resolutamente, para a complementação do seu destino, pois no norte de Minas realizará a descoberta mais importante na história científica do Brasil, única na história da medicina

Chagas começou, consciente ou inconscientemente, a tentar encontrar o fio da meada. Sorriu-lhe de novo o destino. Soube, pelo engenheiro Catarino(...) da presença de uma infinidade de insetos hematófagos, os barbeiros ou chupões, alojados nas frestas das paredes de pau-a-pique⁶. Estes sugadores de sangue saíam, à noite, para se alimentar, picando no rosto os habitantes das paupérrimas choças⁷.

Meu pai levou os insetos ao seu laboratório(...). Examinando o tubo digestivo desses triatomíneos, Chagas encontra um novo tripanossomo, que logo distingue de todos os outros que havia estudado e, particularmente, de um que havia descrito anteriormente no estado das Minas Gerais, o *Trypanosoma minasense*.

Não é difícil imaginar qual a idéia que brotou no espírito de Chagas nessa

⁶ Casas típicas de zonas rurais construídas basicamente com madeira e barro.

⁷ Extrema condição de pobreza.

ocasião, foi a seguinte: 'Poderá o tripanossomo que se encontra nos barbeiros ser a causa do quadro nosológico ⁸ que encontro em Lassance?' Esta interrogação perturbou durante largo tempo as suas noites insones. Bom cientista viu que ela só poderia ser respondida depois de realizada a necessária experimentação.

(FILHO, Carlos Chagas. **MEU PAI**. 1993 Disponível em:<http://www.submarino.net/cchagas/artigos/art1.htm>. Acessado em: 29/09).

Não era do conhecimento de Chagas, mas ele acabara de descobrir uma moléstia que sinalizaria as proporções das desigualdades sociais no Brasil: um exemplo típico de uma injúria resultante das alterações feitas pelo homem sobre o ambiente, a tripanossomíase americana é produto de distorções econômicas e injustiças sociais. Seu agente etiológico, o *T. cruzi*, restrito ao ambiente silvestre, circulava livremente entre mamíferos nativos das regiões rurais sendo transmitido através da picada dos hemípteros⁹ hematófagos ou por ingestão do vetor ou dos mamíferos contaminados. Ao se inserir no ciclo do *Trypanossoma* e do barbeiro, o homem ofereceu-lhes condições favoráveis à sobrevivência. Esse fator ocasionou na inserção de tal patogenia na sociedade atual (VINHAES & DIAS, 2000) .

Devido ao perfil sócio-econômico dos moradores das zonas rurais a doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada . Isso se deve ao fato de que essa enfermidade se restringe à população de baixa renda, o que não desperta o interesse da indústria farmacêutica, que por sua vez não realiza pesquisas suficientes para a criação de novas drogas que visem o tratamento e a cura do Mal de Chagas. Assim o indivíduo infectado acaba por ser marginalizado pela sociedade, por ser considerado incapaz de realizar determinadas funções devido a sua condição de saúde, e enfrenta, além das dificuldades relativas ao seu bem estar e a sua saúde, uma certa exclusão social devido o seu quadro clínico, como por exemplo dificuldades para ser empregado (VINHAES & DIAS, 2000).

Os vetores responsáveis pela transmissão da doença são naturais de regiões rurais, os Triatomíneos, ou barbeiros, como são vulgarmente chamados, se adaptaram bem às casas de pau-a-pique (Figura 8), muito comuns em regiões pouco desenvolvidas no interior do país. Essas casas são construídas basicamente com madeira (na maioria das vezes bambu) entrelaçadas com o uso de cipós, formando vigas horizontais e preenchidas por barro. A construção inadequada dessas moradias pode resultar em uma rápida degradação, além do

⁸ Nosologia, parte da medicina que trata da classificação das doenças.

⁹ Ordem de insetos caracterizados por possuírem peças bucais adaptadas à perfuração e sucção alojado numa longa "tromba" ou "bico", tanto na forma adulta como em ninfas.

aparecimento de rachaduras e fendas, se tornando alvo para os vetores do *T. cruzi* que se instalam nas moradias através dessas aberturas (REY, 2002).



Figura 8: Casa de pau-a-pique

Fonte: EMERSON SILVA, 2012.

Os insetos vetores têm grande relevância médica, visto que constituem a mais comum forma de infecção da enfermidade configurando a via mais eficaz para interferência do ciclo epidemiológico do parasito. Os reservatórios naturais do *T. cruzi*, ou seja, seus hospedeiros no seu habitat natural são mamíferos silvestres como morcegos, gambás e tatus. Já no ambiente domiciliar o protozoário pode ser encontrado em animais domésticos como, por exemplo, cães e gatos. É a partir desses animais que os barbeiros se contaminam com o parasito, transmitindo-os aos humanos (REY, p. 132, 2002)..

Na natureza os triatomíneos são encontrados em fendas de rochas, ninhos de pássaros ou tocas de mamíferos, podendo ser encontrados também nos domicílios citados anteriormente, devido à escassez de alimento em seu habitat ou à tendência de buscarem moradias estáveis com oferta permanente de alimentos. Como foi dito anteriormente a principal causa para a inserção do mal de Chagas na sociedade brasileira foi invasão do ser humano no habitat natural do vetor e do protozoário causador da doença. Sendo assim, é possível estabelecer uma relação entre as condições sociais dos possíveis hospedeiros e a taxa de incidência da doença em populações desfavorecidas (REY, 2002) .

Essa questão é extremamente relevante visto que, sem a interferência do ser humano em áreas rurais, a doença possivelmente não circularia entre humanos, pois se restringiria ao ciclo silvestre, contaminando exclusivamente mamíferos da região. Além do mais, esse fator

nos indica algumas das características do grupo social mais atingido por essa moléstia, que são em sua totalidade pessoas com baixa renda que não encontram condições adequadas de moradias, e vivem com condições precárias em áreas endêmicas (NETO, 2008).

A invasão desses territórios leva conseqüentemente à maior convivência com os vetores, que encontram nas casas de pau-a-pique condições perfeitas para viver e se reproduzir, devido às características desse tipo de moradia. Por fim essas casas acabam sendo favoráveis não só para abrigar os insetos, mas também influenciam na proliferação dos mesmos, já que oferecem proteção contra predadores que serviriam como uma forma de controle natural das populações dos vetores e oferecem à eles uma maior oferta de alimento, o que conseqüentemente é relevante para aumentar o número de vítimas do mal de Chagas no país (LANA & TAFURI, 199-).

3 SISTEMÁTICA: GÊNERO *TRYPANOSSOMA*

O Reino Protocista agrupa diversos indivíduos com características variadas. No grupo, são encontrados organismos eucariontes, unicelulares, pluricelulares, autótrofos (todas as espécies de algas) e heterótrofos (todos os demais protistas). Este reino é constituído por cerca de 65.000 espécies conhecidas, das quais 50% são fósseis e o restante ainda vive hoje; destes, aproximadamente 25.000 são de vida livre, 10.000 espécies são parasitos dos mais variados animais e apenas cerca de 30 espécies atingem o homem (TORTORA, 2000). A célula é basicamente constituída pelo citoplasma, o núcleo e diversas organelas responsáveis por diferentes funções. São variadas as formas adotadas pelas células, assim como as atividades metabólicas desempenhadas pela mesma para a realização de inúmeras funções necessárias à sobrevivência desses organismos. Por ser única, a célula deve se dividir em regiões e estruturas especializadas para a realização dessas funções (PESSÔA, p. 37, 1977).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado desprovido de clorofila e pertencente à ordem *Kinetoplastida*. Nessa ordem encontramos representantes com um ou dois flagelos, uma única mitocôndria que percorre todo o corpo celular e uma estrutura bastante singular que se encontra junto à base do flagelo, rica em DNA e capaz de auto-replicação que caracteriza esse grupo, conhecida como cinetoplasto (Figura 9). Dentro desse grupo encontramos a família *Trypanosomatidae*, seus membros são parasitas obrigatórios dos mais diversos seres vivos, podendo infectar outros parasitos, plantas ou animais (invertebrados ou vertebrados), sendo as grandes maiorias residentes temporários ou permanentes do tubo digestivo de insetos (REY, p.128, 2002).

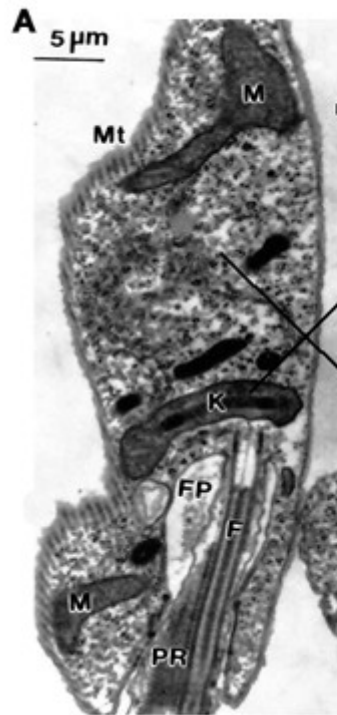


Figura 9: Detalhes sobre a estrutura do corpo celular do *T. Cruzi*. K: Cinetoplasto

Fonte: FIOCRUZ, 2011.

Nessa família estão presentes espécies de protozoários de grande importância para a medicina humana e a veterinária, nos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Entre os membros mais importantes temos o causador da trypanossomose americana, o *T. cruzi*, que é objeto desse trabalho. Além do *Trypanosoma brucei gambiense* e o *T. b. rhodesiense*, ambos causadores da trypanossomose africana (doença do sono) e as diversas espécies do gênero *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *L. maxicana*, *L. peruviana*, *L. tropica*), causadores de leishmanioses tegumentares, e os *L. donovani* e *L. infantum*, causadores do calazar ¹⁰ (REY, 2002).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário relativamente pequeno e tipicamente em forma de “C” em duas das três fases pelas qual passa. Seu corpo celular é alongado e achatado e tende a se afilar em ambas as extremidades, principalmente na posterior de onde surge o flagelo. Apresenta um cinetoplasto volumoso, que se encontra perto da extremidade posterior do corpo, junto à base do flagelo. Sua reprodução em insetos é extracelular e ocorre na fase epimastigota. Já em mamíferos a reprodução é intracelular na fase amastigota, quando o protozoário assume uma forma arredondada com o flagelo atrofiado. Entre os mamíferos que o

¹⁰ Leishmaniose visceral.

T. cruzi infecta, temos como os mais comuns: o homem, cães, gatos, tatus, morcegos e gambás. Como já foi dito anteriormente, o homem se inseriu no ciclo do parasito devido às diversas complicações socioeconômicas que atingem nossa sociedade, não sendo então considerado um “hospedeiro natural” do *T. cruzi*.

As implicações da doença causadas pelo *T. cruzi* sobre as vítimas são extremamente perturbadoras, sendo necessária a descoberta imediata da cura e de novos tratamentos eficazes contra a enfermidade. Para tanto, a comunidade farmacêutica necessita de um alvo biológico para o desenvolvimento de novas drogas ou vacinas. Ou seja, necessitam de uma estrutura essencial ao protozoário que possam tomar como alvo e assim desenvolver medicamentos que inibam os efeitos realizados em favor da sobrevivência do parasito (VINHAES & DIAS, 2000).

4 CISTEÍNO PROTEASE: A CRUZIPAÍNA

4.1 FUÇÕES DA CRUZIPAÍNA NO TRYPANOSSOMA CRUZI

A cisteíno protease apresenta diversas isoformas, sendo sua forma majoritária a cruzipaína. Foi inicialmente identificada como alvo terapêutico em meados da década de 1990. Considerada um fator de virulência¹¹ do *T. cruzi* devido a redução da invasão celular que ocorria ao se tratar os protozoário na forma infectante com inibidores da cisteíno protease. É encontrada abundantemente no parasito, sendo menos abundante na forma infectante (SCHARFSTEIN, 2010).

Com ampla especificidade catalítica, hidrolisa inúmeras proteínas. É essencial para a replicação intracelular do parasito nas formas amastigota e epimastigota. Sua ação característica enzimática lisossomal está relacionada à nutrição do parasito por meio de hidrólise de peptídeos e proteínas (SCHARFSTEIN *et al. apud* SÁ 2000). Tais atividades promovem o crescimento do *T. cruzi*, assim como o da célula hospedeira.

Além de proporcionar esse crescimento, a atividade enzimática da cisteíno proporciona a diferenciação do protozoário na forma amastigota. Ela é responsável também pela maior atividade proteolítica em todas as fases do ciclo de vida do *T. cruzi* e pela produção de peptídeos que estimulam a internalização de tripomastigotas por células cardiovasculares (SCHARFSTEIN *et al. apud* SÁ 2000).

Observa-se que tal enzima garante não só a sobrevivência do *T. cruzi*, como também seu crescimento e muitas das diversas atividades desempenhadas por este e que são essenciais à sua sobrevivência. Sem desconsiderar a importância da cisteíno protease a comunidade farmacêutica encontrou na cruzipaína, o que poderá ser a solução para a busca da cura da doença de Chagas. Por esses motivos ela ainda é considerada um excelente alvo biológico, já que sem essa enzima não é possível ao protozoário realizar funções básicas a sua sobrevivência levando-o à morte celular.

¹¹ São estruturas, produtos ou estratégias que os parasitos utilizam para “driblar” o sistema de defesa do hospedeiro e causar uma infecção.

4.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Muitos estudos vêm sendo realizados desde a descoberta da doença de Chagas, no sentido de encontrar drogas eficazes para o tratamento desta enfermidade tanto na fase aguda, quanto na fase crônica. Diversos compostos foram testados no decorrer dos anos, entretanto nenhum deles obteve êxito sem que alguns resultados fossem controversos quando testados em humanos (SÁ, 2008).

Desde a década de 1970, alguns nitrofuranos vêm sendo utilizados como opção de tratamento para o mal de Chagas sendo eles: o Nifurtimox (Figura 10) e o Benzonidazol (Figura 11). Os doentes tratados com estas drogas apresentaram boa resposta no tratamento de infecções agudas, entretanto os efeitos não são os mesmos na fase crônica, apresentando assim, baixos índices de cura nesta fase. Além da baixa taxa de cura destes medicamentos na fase crônica, a toxicidade e os efeitos colaterais característicos destes fármacos inviabilizam o tratamento com esses compostos, tornando a utilização deles muito restrita (BRENER, COURA, JANNIN, GUEDES *apud* PÔSSA, 2008, p.5)

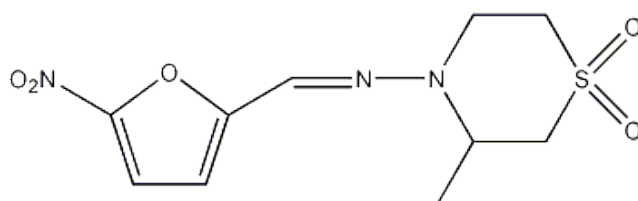


Figura 10: Fórmula estrutural do nifurtimox.

Fonte: MORAVEK, [entre 1997 e 2012].

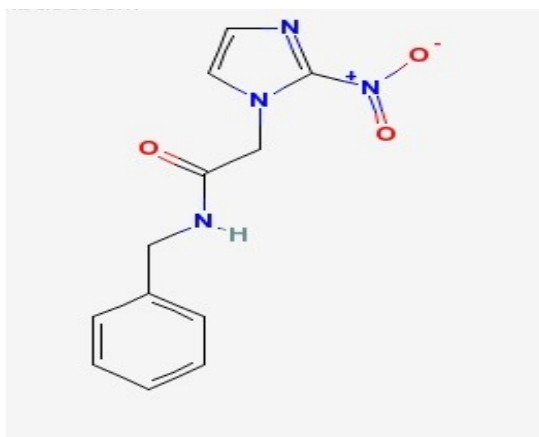


Figura 11: Fórmula estrutural do benzonidazol.

Fonte: CHEMBASE, [entre 2007 e 2011]

Neste contexto, estudos realizados acerca da estrutura bioquímica do *T. cruzi* têm permitido a identificação de vias metabólicas essenciais ao parasito, além de alvos terapêuticos específicos associados às funções vitais do mesmo, relacionados à infectividade e virulência do protozoário (PÔSSA, 2008, p. 6). Tais estudos visam a criação de fármacos cuja ação pressupõe a ligação de um pequena molécula (ligante) a uma macromolécula (receptor), normalmente uma proteína associada a uma condição de doença ou disfunção em humanos (DIAS *et al.* 2009.). Entre essas macromoléculas temos a cisteína protease, responsável pela maior atividade proteolítica em todas as fases do ciclo de vida do *T. cruzi*, desempenhando papel essencial na sobrevivência e crescimento deste (PÔSSA, 2008, p.6). Foi observado que os inibidores da cruzipaina, podem induzir cura parasitológica da doença em modelos murinos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, com toxicidade mínima. Os estudos sobre essa estrutura vêm sendo realizados desde a década de 1970, não havendo ainda hoje, inibidores adequados que possam ser usados para a cura deste mal (MORALES, 2005, p.129).

A primeira descrição realizada acerca da presença de enzimas proteolíticas em estratos do *T. cruzi* foi realizada por Erney Camargo e seus colaboradores na década de 1970. Pouco tempo depois, foi realizada uma descrição sobre as propriedades físico-químicas de uma tiol-protease do parasito na forma epimastigota, feita por Rangel e seus colaboradores. Ainda nesta década, houve uma convergência entre três linhas de pesquisa que vinham se desenvolvendo separadamente no Rio de Janeiro, Buenos Aires e São Francisco em torno desta protease. Cazzulo e colaboradores [entre 1970 e 1983] isolaram a principal cisteína protease lisossomal do *Trypanosoma cruzi*, purificando-o e caracterizando suas propriedades enzimáticas. A partir dessa pesquisa, a cisteína protease foi batizada como “cruzipaina” ou “cruzaína”. Mckerrow e colaboradores descreveram a sequência parcial de oligonucleotídeos de uma cisteína protease de *T. cruzi* constituída de resíduos de cisteína (Cys), de histidina (His) e de asparagina (Asn), que apresentavam propriedades características das enzimas da superfamília da papaína¹². Nessa mesma época Julio Scharfstein junto de sua equipe demonstrou que a cruzaína era idêntica a uma glicoproteína definida pelos mesmos como um antígeno dominante de *T. cruzi*, a GP57/51. Além da GP57/51 ser virtualmente idênticas à cruzipaina, foi constatado que tratava-se de uma tiol-protease da família papaína, capaz de degradar substratos protéicos de alto peso molecular, tanto em pH neutro quanto ácido (SCHARFSTEIN, 2010).

¹² É uma enzima alcalóide (substância de caráter básico derivada principalmente de plantas) extraída do mamão.

Na década seguinte, em 1983, Mendonça Previato e seus colaboradores isolaram e caracterizaram diversas frações de extratos aquosos (fervidos) do *T. cruzi* na forma epimastigota (forma não infectante). Um glicoconjugado¹³ com peso molecular de 25.000 daltons, denominado GP25 destacava-se pela presença de alto teor de cadeias de oligossacarídeos¹⁴ O-ligados. Feita a análise da antigenicidade dessa glicoproteína, constatou-se que a mesma serviria como uma ferramenta útil para o sorodiagnóstico do mal de Chagas (SCHARFSTEIN, 2010).

Devido a grande disponibilidade da GP25, foram isolados anticorpos IgG¹⁵ humanos através da cromatografia de afinidade¹⁶. Uma análise realizada sobre o perfil de expressão da GP25 revelou sua presença em todos os estágios morfológicos pelo qual o parasito passava. Na forma epimastigota foi constatada uma forte densidade da glicoproteína na superfície celular do protozoário, enquanto a expressão da mesma na forma infectante (tripomastigota sanguícola) se mostrou mais discreta, sendo bem menos abundante nessa forma (SCHARFSTEIN, 2010).

Em relação à reação discreta de anticorpos na superfície celular do parasito na forma tripomastigota sanguícola, constatou-se que estes anticorpos foram capazes de diminuir significativamente a infecção pelo *T. cruzi* nas células da musculatura lisa em humanos. Apesar da eficácia dos anticorpos nesse estudo, a reação do experimento em células do tecido conjuntivo (fibroblastos) obtidas do mesmo doador mostrou um resultado diferenciado dos ensaios realizados com células de músculo liso, já que a infectividade não havia sido prejudicada pela a ação destes mesmos anticorpos (SCHARFSTEIN, 2010).

Devido ao desenvolvimento precário dos meios de pesquisa, não era possível, naquela época, explicar os motivos pelos quais ocorriam tais reações diferenciadas dos anticorpos nesses dois modelos de interação celular. Além desse empecilho, as pesquisas em torno da GP25 apresentavam outras dificuldades, tais como: a caracterização molecular da glicoproteína que se mostrava penosa, devido à impossibilidade de se realizar seu sequenciamento, e a complexidade do padrão isoelétrico¹⁷ da GP25. Esses problemas foram em parte contornados quando foram obtidos anticorpos da GP57/51. A análise do padrão de imunoprecipitação de antígenos revelou que os lisados de epimastigotas que haviam sido

¹³ Carboidratos covalentemente ligados a lipídeos ou proteínas

¹⁴ São carboidratos que originam dois ou três monossacarídeos por meio de hidrólise.

¹⁵ Imunoglobulinas.

¹⁶ Processo de separação de misturas.

¹⁷ Característica molecular relacionada às cargas elétricas das proteínas. Tem grande importância para o estudo de outras características bioquímicas, como por exemplo, a solubilidade.

tratados com inibidores de protease apresentaram apenas duas bandas características de peso 57/51.000 daltons, sendo denominado a partir daí como antígeno GP57/51. Ao se omitir inibidores de protease na preparação de lisados celulares, constatou-se que a GP57/51 era sensível à proteólise. Depois, foi comprovado que a GP57/51 reagia fortemente com os anticorpos da GP25, concluindo assim que ambas as glicoproteínas compartilhavam dos mesmos epitopos dominantes.

Baseando-se nessas informações foi concluído que a cruzipaina era o produto biossintético primário produzido pelo protozoário na forma epimastigota e que a GP25 era o produto estável gerado pela proteólise da cruzipaina (SCHARFSTEIN, 2010).

No fim da década de 1990 surgiram diversos grupos de estudos que propunham ligantes para a inibição da cisteína protease. Entre eles, Rongshi Li e colaboradores (1996) ao estudarem séries de derivados de chalconas e de hidrazidas, identificando um derivado de hidrazida como o inibidor mais eficaz de cruzipaina. Poucos anos depois, Roush (1998) identificou como melhores inibidores, derivados de epóxi-cetonas. Na mesma época Roush e colaboradores estudaram séries de aldeídos e derivados de vinil sulfonas identificando-os como os mais potentes na inibição da cisteína protease (SCHEIDT *et al.* 1998).

Roush e colaboradores (2000) continuaram a estudar possíveis novos inibidores contra a cruzipaina, identificaram um derivado de O-benzil hidroximato como um inibidor potente e específico com alta seletividade relativa se comparada com outras cisteínas proteases. No ano seguinte identificaram novos compostos como promissores inibidores da cruzipaina, ao estudarem uma série de derivados de N-alcoxivinilsulfonamida.

Mais tarde, Ellman e colaboradores identificaram novos inibidores derivados de cetonas (Huang & Ellman 2002; Huang *et al.* 2003). Contemporaneamente Du e colaboradores (2002) estudaram série de moléculas com estruturas menores do que as anteriores, os Tioil Semicarbazona visando melhorar a biodisponibilidade oral. Foi verificado que tais compostos aumentavam a sobrevivência de células infectadas pelo *T. cruzi*, além de apresentarem ação tripanocida. Dois anos depois, Fujji e colaboradores (*apud* PÔSSA, 2005) verificaram que o composto anterior também agia sobre uma cisteína protease do *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Entretanto, neste trabalho, foi observado que este composto não se mostrava tão eficiente em relação à inibição da proliferação do *T. cruzi* (PÔSSA, 2008, p. 6).

Em relação à busca de novas drogas inibidoras de cruzipaina para o tratamento da tripanossomíase americana, estudos ainda devem ser feitos, já que novos fármacos são necessários imediatamente, e continuarão a ser no futuro uma vez que o parasito adquire, através de diversos mecanismos, resistência aos quimioterápicos mais utilizados. Para tanto, a comunidade médica têm promissoras oportunidades de estudos, visto que o desenvolvimento da biologia molecular e estrutural, e da química médica têm mostrado significativos avanços, permitindo assim um estudo mais aprofundado das estruturas moleculares de importância para o *T. cruzi*, que possam servir como receptores biológicos para moléculas ligantes, adquiridas com a criação de fármacos adequados para o tratamento deste mal (DIAS *et al* .2009).

5 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA CRUZIPAÍNA

Diferentes inibidores de cisteíno proteases (Figura 12) vêm sendo testados ao longo dos anos, desde a descoberta dessa enzima e de sua importância, como por exemplo, os diazometanos e halometil cetonas, sendo estes tóxicos para células do hospedeiro. Já outros compostos apresentam eficácia máxima, reduzindo os sintomas e impedindo a proliferação dos protozoários com toxicidade mínima. Tais compostos foram testados em modelos murinos apresentando êxito nas fases crônica e aguda. Neste grupo de drogas se encontram as Tiol-éteres-semicarbazonas, por exemplo (PÔSSA, 2008).

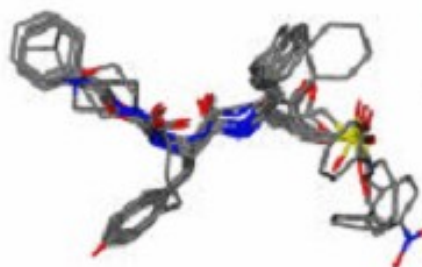


Figura 12: Representação do alinhamento dos inibidores da cruzipaína

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, SP.

Estudos mostraram que a inibição da cruzipaína se mostrou capaz de interferir na replicação do protozoário em ambas as formas replicantes, tanto intracelular (amastigota), quanto extracelular (epimastigota), bloqueando-a. Sua inibição se mostrou capaz também de dificultar a invasão celular, impedindo assim a diferenciação do parasito entre as formas tripomastigota-amastigota (DU *apud* PÔSSA; MORALES, 2005). Dessa maneira pode-se impedir o surgimento da cardiopatia chagásica, do megacólon ou do megaesofago, sintomas característicos da doença, causados pela presença de grandes populações de protozoários parasitando as células.

Em outros estudos, epimastigotas foram tratados com inibidores de cisteíno protease e apresentaram anormalidades no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, devido o acúmulo de cruzipaína nos compartimentos vesiculares que foi constatado após expor os parasitos aos inibidores. O composto em questão interrompia o tráfego de proteínas, levando o protozoário à morte celular após 48 horas de tratamento. Em roedores o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*, não só apresentou os resultados expostos anteriormente, como também

diminuiu a infiltração linfocitária da lesão miocárdia e reduziu a parasitemia, contribuindo assim para reversão de alguns efeitos deixados pela doença. Neste mesmo experimento, os inibidores de cruzipaina teriam promovido a cura do hospedeiro no estágio crônico após um tratamento de 21 dias (ENGEL *apud* SÁ, 2008, p. 15).

Com estes dados é possível comprovar que a cruzipaina não só é de grande importância para a sobrevivência do *T. cruzi*, mas representa a possível solução de diversos problemas acarretados por essa zoonose em nosso país. A partir dessa enzima, pode ser possível o desenvolvimento de fármacos eficientes contra a tripanossomíase americana, acarretando assim na elaboração de um tratamento eficaz que atenda as necessidades de toda uma população suscetível ao mal de Chagas.

O uso de inibidores específicos contra as cisteíno proteases visa a realização de uma ligação destes compostos com macromoléculas consideradas alvos (neste caso a cruzipaina). Essa interação é feita pelos inibidores da cruzipaina acarretando diversos efeitos, que têm por objetivo não somente a morte do protozoário, como também a máxima redução dos efeitos deixados pela patogenicidade com os mínimos efeitos colaterais prejudiciais possíveis. A eficiência do inibidor é comprovada, portanto, quando este consegue alcançar os objetivos citados. Caso contrário, novos estudos são realizados para a busca de novos inibidores, tomando por base estudos anteriores, quer tenham sido bem sucedidos ou não. Nesse caso, até mesmo a falha de um fármaco é importante, pois permite que futuras pesquisas sejam realizadas sem que se cometam os mesmos erros, facilitando assim o trabalho de pesquisadores que também desejem encontrar fármacos mais eficientes para o tratamento do mal de Chagas (DU *apud* PÔSSA, 2005).

É importante ressaltar que os efeitos da inibição deste composto são variados dependendo da forma em que o parasito se encontra e da composição química desses inibidores, onde alguns apresentam efeitos colaterais prejudiciais aos hospedeiros, enquanto outros apresentam toxicidade mínima (ENGEL *apud* SÁ, 2008).

6 CONCLUSÃO

É possível entender em que dimensões a presença da cruzipáina é essencial ao *Trypanossoma cruzi*. Se utilizando dessa enzima, o protozoário pode realizar as diversas atividades necessária a sua sobrevivência. Para tanto é preciso que o mesmo encerre seu ciclo vital característico, em que são presentes um total de dois hospedeiros. Ao realizá-lo o *T. cruzi* traz ao hospedeiro vertebrado, nesse caso o humano, diversas complicações, não só patológicas, como também sócio-econômicas. Sendo assim nos é necessário uma maneira de erradicar esse mal de maneira eficiente.

Uma possível solução para o mal de chagas, o cisteíno protease característico do *T. cruzi* e de maior importância para o mesmo. Tal elemento tem grande potencial farmacêutico, além de abrir novos horizontes para a quimioterapia da doença de Chagas.

Sua importância e as diversas funções desempenhadas fazem dessa glicoproteína a base para inúmeras pesquisas com os mais diversos fins. Muitas delas utilizadas nesse trabalho contribuíram para a finalização do mesmo, visando identificar as funções desempenhadas pela cisteíno protease no decorrer do ciclo do agente causal do mal de Chagas. Outros objetivos foram traçados sem obtenção de êxito, devido à escassez de fontes que pudessem contribuir para a finalização deste projeto.

Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho nos permite entender melhor de que maneira a cisteíno protease de *T. cruzi* atua neste organismo e que efeitos a mesma pode proporcionar no hospedeiro vertebrado. Foi identificada também a importância dessa estrutura, nos permitindo concluir que sem ela, não seria possível ao protozoário sobreviver e por consequência, infectar os mais variados hospedeiros. Além disso, esse projeto poderá auxiliar a realização de futuros trabalhos que abordem o mesmo tema, assim como outros projetos que tratem de outros aspectos pertinentes ao *Trypanossoma cruzi* e a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

BALTAR, Luiz. **Artigo Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, RJ. [s.n.]. Disponível em: <<http://www.flickr.com/photos/luizbaltar/4096363884/>>. Acessado em: 25 de jan de 2012

CAZZULO, Juan Jose. **La cruzipaina, cisteína proteinase principal del trypanosoma cruzi**: secuencia y organizacion genómica de los genes que la codifican. Buenos Aires. [s.n.]. 1999. Disponível em: <bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/.../online/?>. Acesso em: 12 de jul 2011

CHEMBASE. **Chemical Compounds Database**: benzonidazole. S.l. [s.n.]. [entre 2007 e 2011]. Disponível em: <http://www.chembase.com/cbid_31593.htm>. Acessado em: 23 de jan de 2012

COSTA, Jane. **Distribuição e caracterização de diferentes populações de Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16(Sup. 2):93-95, 2000. Disponível em: <<http://seresvivosdorn.blogspot.com/2010/10/barbeirotriatoma-brasiliensis-neiva1911.html>>. Acesso em: 21 de Nov de 2011.

DIAS, Luiz C. *et al.* **Quimioterapia da doença de chagas**: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. S.l. [s.n.]. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900038>. Acesso em: 23 de nov de 2011

FILHO, Carlos Chagas. **Meu pai**. S.l. 1993. Disponível em: <<http://www.submarino.net/cchagas/artigos/art1.htm>>. Acessado em: 29 de set de 2011

FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, RJ. [s.n.]. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>. Acesso em: 02 de jul de 2011

FUGESP. **Trypanossoma cruzi**. Rio de Janeiro. RJ. [s.n.]. Disponível em: <http://www.fugesp.org.br/fugesp_boletim_04.asp>. Acesso em: 14 de out de 2010

LANA, Marta de. TAFURI, Washington Luiz. **Trypanossoma cruzi e doença de chagas**. S.l. 199-.

MALVEZZI, Alberto. REZENDE, Leandro de. AMARAL, Antonia Tavares do. **Virtual screening de inibidores da cruzipaina**. Sociedade Brasileira de Química. S.l. [entre 1998 e 2005].

MORALES, Alfonso J. Redríguez. **Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de chagas**. S.l. [s.n.]. 2005. p. 125-129.

MORAVEK. **Nifurtimox**. S.l. [entre 1997 e 2012]. Disponível em: <<http://www.moravek.com/CatalogFiles/Nifurtimox.htm>>. Acessado em 17 de jan de 2012.

NETO, Vicente Amato. **Centenário da doença de chagas**. São Paulo, SP. 2008. Revista Saúde Pública – Carta ao editor.

Nifurtimox. S.l. [s.n.]. [entre 1997 e 2012]. Disponível em: <<http://www.moravek.com/CatalogFiles/Nifurtimox.htm>> Acessado em: 23 de jan de 2012

PESSÔA, Samuel B. MARTINS, Amilcar Vianna. **Parasitologia médica**. S.l. 10^a Ed. 1977. p. 143-160.

PÔSSA, Marcela Auxiliadora Souza. NUPEB. Ouro Preto, MG. [s.n.]. **Avaliação da participação das ecto-nucleotidases do Trypanossoma cruzi nos processos de infecção e virulência em modelos murinos**. 2008. p. 5-7.

REY, Luís. **Parasitologia**. S.l. 2^a ed. 2002. p. 128-150.

SÁ, Adriana Alves de. UnB. **Tratamento multidrogas da doença de chagas experimental**. Brasília, DF. 2008. p. 14-15. [s.n]. Disponível em: <<http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/1466>>. Acesso em: 14 de maio de 2011

SCHAERFSTEIN, Julio. FIOCRUZ. **Sistema Cinina**. Rio de Janeiro, RJ. [s.n.]. 2010. Disponível em: <www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=169>. Acesso em: 03 de out de 2011.

SILVA, Emerson. **Casa de pau-a-pique**. Porto Belo, SC. [s.n.]. 2012. Disponível em: <<http://emersonricardosilva.blogspot.com/2010/10/casa-de-pau-pique.html>>. Acesso em: 30 de jan de 2012.

SUBMARINO. **A descoberta da doença de chagas**. S.l. [s.n.]. 1999. Disponível em: <<http://www.submarino.net/cchagas/artigos/art1.htm>>. Acesso em: 13 de abril de 2011.

TOTORA, G. J., *et al.* **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artemed. 2000. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/microorganismos/PROTOZOARIOS.htm>. Acesso em: 10 de nov de 2011

VINHAES, Márcio C., DIAS, João Carlos Pinto. **Doença de Chagas no Brasil**. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro, RJ. [s.n.]. 2000. p. 7-12. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v16s2/3480.pdf>>. Acesso em: 14 de maio 2011