

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA**

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

**AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DERIVADAS DE DIAMINAS DO
FERROCENO NO METABOLISMO OXIDATIVO EM CEPAS DE *Trypanosoma cruzi***

**Araraquara
2013**

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

**AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DERIVADAS DE DIAMINAS DO
FERROCENO NO METABOLISMO OXIDATIVO EM CEPAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

**Araraquara
2013**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

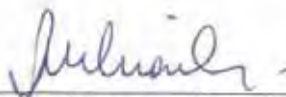
- J58e Kohatsu, Andréa Akiko Nakaima
Avaliação das estruturas químicas derivadas de diaminas do ferroceno no metabolismo oxidativo em cepas de *Trypanosoma cruzi* / Andréa Akiko Nakaima Kohatsu . – Araraquara, 2013
88 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli
1. *Trypanosoma cruzi* 2. Diaminas do ferroceno. 3. Benzonidazol. 4. Proteínas antioxidantes. I. Cicarelli, Regina Maria Barretto, orient.. II. Título.

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

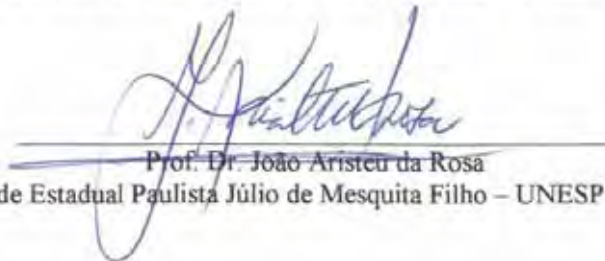
**AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DERIVADAS DE DIAMINAS DO
FERROCENO NO METABOLISMO OXIDATIVO
EM CEPAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

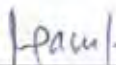
COMISSÃO EXAMINADORA



Profª. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli (orientadora)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Araraquara



Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Araraquara



Prof. Dr. Mauricio Bacci Júnior
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Rio Claro

Araraquara, 11 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Celina e Antônio pelo apoio e
compreensão, sem vocês nada disso teria
acontecido.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP pela oportunidade de realizar este trabalho.

À professora Dra. Regina Cicarelli pelo incentivo e confiança de desenvolver este trabalho, que foram fundamentais para o meu crescimento científico, profissional e pessoal. O meu muito obrigado por ter me recebido em seu laboratório e compartilhado seus conhecimentos.

Ao professor Dr. João Aristeu, à professora Dra. Maria Vargas e à professora Dra. Vera Isaac, por terem cedido os parasitos, as substâncias e as células de hepatoma humano, respectivamente, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Marco Túlio pelas discussões científicas que foram de grande importância para o meu aprendizado e para a conclusão deste trabalho.

À Flávia e Bruna pelo auxílio nos experimentos e pela amizade.

À Valéria pela ajuda com os coelhos e pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (Fundunesp) pelo auxílio financeiro.

A todos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos pela companhia e amizade.

Às funcionárias da Pós-graduação e da biblioteca pelos serviços prestados.

A todas as pessoas que fizeram parte na construção deste trabalho sempre me apoiando.

Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.

Isaac Newton

**RESUMO
(ABSTRACT)**

RESUMO

No momento há apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, nifurtimox e benzonidazol, ambos de ações limitadas. Assim, a compreensão dos mecanismos utilizados por *T. cruzi* para diminuir os efeitos citotóxicos de fármacos e a busca de potenciais moléculas para quimioterapia, bem como os alvos para elas, são de extrema importância. O aumento na produção de certas enzimas do metabolismo oxidativo seria responsável pela resistência das cepas do parasito ao benzonidazol (BZ). Tais enzimas são: triparedoxina peroxidase (mTcTXNPx) que catalisa a redução de peróxidos, superóxido dismutase (mTcSOD) que realiza a dismutação do ânion superóxido e *old yellow enzyme* (cTcOYE) que está envolvida na redução de substâncias tripanossomicidas, como naftoquinonas e compostos nitroheterocíclicos. Estudos demonstram que a atividade antimalarial da cloroquina foi aumentada com a adição de ferroceno. Neste trabalho, foram avaliadas as diferenças de suscetibilidade entre seis cepas de *T. cruzi* (Y, Bolívia, SI1, SIGR3, SI8 e QMII) em relação a três estruturas derivadas de diaminas do ferroceno e a expressão das proteínas antioxidativas. A substância AAC09 mostrou maior citotoxicidade, com CI_{50} de 2,21 μM para a cepa menos resistente (cepa Y) e 15,20 μM (cepa QMII) para a mais resistente, enquanto que para BZ foi 27,28 μM (cepa SI1) e 105,28 μM (cepa SIGR3), respectivamente. Após tratamento, a expressão das enzimas mTcTXNP (25,5 kDa) e cTcOYE (43 kDa) não aumentaram em cepas mais resistentes aos derivados de diaminas do ferroceno e BZ. Por outro lado, somente ocorreu aumento de expressão de mTcTXNPx na cepa Y tratada com BZ. Os resultados obtidos mostraram que cada cepa apresenta distinta suscetibilidade a um agente oxidativo e as cepas mais resistentes não aumentaram a expressão das enzimas. Em decorrência desses resultados, deduz-se que outros mecanismos possam auxiliar as cepas de *T. cruzi* a resistirem às espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, diaminas do ferroceno, benzonidazol, proteínas antioxidantes

ABSTRACT

At the moment there are only two drugs available for the treatment of Chagas disease, nifurtimox and benznidazole, both of use restricted. Understanding the mechanisms used by *T. cruzi* to reduce the cytotoxic effects of drugs and finding potential molecules for chemotherapy, as well as targets for them, are extremely important. Resistance to benznidazole (BZ) in *T. cruzi* strains may be caused by increased production of enzymes that act on oxidative metabolism. Such enzymes are: trypanothione peroxidase (mTcTXNPx), which catalyzes the reduction of peroxides, superoxide dismutase (mTcSOD), which performs the dismutation of superoxide anion and old yellow enzyme (cTcOYE), which is related to the reduction of trypanocidal substances, such as naphthoquinones and nitroheterocyclic compounds. Studies showed that the antimalarial activity of chloroquine was increased with the addition of ferrocene. Herein the susceptibilities in six *T. cruzi* strains (Y, Bolivia, SI1, SIGR3, SI8 and QMII) were analyzed in relation to three structures of ferrocene diamine derivatives and the expression of antioxidant proteins. The AAC09 substance showed higher cytotoxicity, with IC_{50} of 2.21 μ M for the less resistant strain (Y strain) and 15.20 μ M (QMII strain) for more resistant, whereas to BZ was 27.28 μ M (strain SI1) and 105.28 μ M (SIGR3), respectively. After treatment, the expression of the enzymes mTcTXNP (25.5 kDa) and cTcOYE (43 kDa) did not increase in more resistant strains to ferrocene diamine derivatives and BZ. However, there was increased expression of mTcTXNPx only in the Y strain treated with BZ. The results showed that each strain exhibited different susceptibility to oxidative agent and the most resistant strains did not enhance expression of these enzymes. Based on these findings, probably other mechanisms may be involved in resistance to reactive oxygen species in *T. cruzi* strains.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, ferrocene diamine derivatives, benznidazole, antioxidative proteins

**LISTAS
E
SUMÁRIO**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo biológico do protozoário <i>T. cruzi</i>	19
Figura 2	Morfologia de <i>T. cruzi</i>	20
Figura 3	Distribuição mundial da enfermidade 2006-2009.....	21
Figura 4	Classificação das populações de <i>T. cruzi</i> em DTU	22
Figura 5	Distribuição geográfica de <i>T. cruzi</i> em DTUs nos ciclos silvestres e domésticos	23
Figura 6	Estruturas químicas do nifurtimox e benzonidazol.....	23
Figura 7	Produção de espécies reativas de oxigênio a partir da redução do oxigênio	25
Figura 8	Estrutura do ferroceno e cátion ferrocênio	30
Figura 9	Reações de oxidação do ferroceno e redução do cátion ferrocênio	30
Figura 10	Estruturas dos antimaláricos cloroquina e ferroquina	31
Figura 11	Síntese dos derivados de diaminas do ferroceno	39
Figura 12	Ensaio citotóxico com as formas epimastigotas das cepas de <i>T. cruzi</i>	40
Figura 13	Período de tratamento dos parasitos com BZ	45
Figura 14	Tratamentos de <i>T. cruzi</i> para expressarem as proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE	46
Figura 15	Obtenção dos extratos totais de <i>T. cruzi</i> tratados para expressarem as proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE	47
Figura 16	Quantificação das proteínas presentes nos extratos totais e avaliação de expressão das proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE.....	48
Figura 17	Estruturas dos derivados de diaminas do ferroceno	50
Figura 18	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	52
Figura 19	Confirmação da produção de anticorpos policlonais por <i>Western blotting</i>	53
Figura 20	Curvas de crescimento das cepas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meio LIT	54
Figura 21	<i>Western blotting</i> dos extratos totais (10 µg/poço) das cepas de <i>T. cruzi</i> tratadas com a substância AAC10 e BZ e revelado com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400).....	56
Figura 22	<i>Western blotting</i> dos extratos totais (10 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com as substâncias AAC04 e AAC09 e revelado com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400).....	57
Figura 23	<i>Western blotting</i> dos extratos totais (3 µg/poço) das cepas de <i>T. cruzi</i> tratadas com a substância AAC10 e BZ e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:600)..	59

Figura 24	Western blotting dos extratos totais (3 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com as substâncias AAC04 e AAC09 e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:600).....	60
Figura 25	SDS-PAGE 10 % corado por <i>Coomassie Blue</i> dos extratos totais (10 µg/poço) das cepas de <i>T. cruzi</i> tratadas com a substância AAC10 e BZ.....	62
Figura 26	SDS-PAGE 10 % corado por <i>Coomassie Blue</i> dos extratos totais (10 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com as substâncias AAC04 e AAC09	63
Figura 27	SDS-PAGE 10 % corado por <i>Coomassie Blue</i> dos extratos totais (3 µg/poço) das cepas de <i>T. cruzi</i> tratadas com a substância AAC10 e BZ.....	63
Figura 28	SDS-PAGE 10 % corado por <i>Coomassie Blue</i> dos extratos totais (3 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com as substâncias AAC04 e AAC09	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação das sequências nucleotídicas	42
Tabela 2	Avaliação da suscetibilidade das cepas de <i>T. cruzi</i> , formas epimastigotas, a diaminas do ferroceno e benzonidazol.....	51
Tabela 3	Concentração inibitória (CI ₅₀) de HepG2 e índice de segurança (IS)	51
Tabela 4	Polipeptídios reconhecidos pelo anticorpo anti mTcTXNPx.....	58
Tabela 5	Polipeptídios reconhecidos pelo anticorpo anti cTcOYE	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC04/AAC09/AAC10	Derivados de diaminas do ferroceno
atm	Pressão atmosférica
BZ	Benzonidazol
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate</i>
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CLFP	Cromatografia líquida rápida para proteínas
$\text{CO}_3^{\bullet-}$	Radical bicarbonato
cTcOYE	<i>Old yellow enzyme</i> citosólica de <i>T. cruzi</i>
DAB	<i>Diaminobenzidinetetrahydrochloride</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe^{+3}	Íon ferro
FMN	Flavina mononucleotídeo
g (FCR)	Força centrífuga relativa
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HepG2	Célula de hepatoma humano
IgG	Imunoglobulina G
iNOs	Óxido nítrico sintase
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IS	Índice de segurança
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
Luminol	5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona
min	Minuto
mTcSOD	Superóxido dismutase mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
mTcTXNPx	Triparedoxina peroxidase mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide</i>
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
$\bullet\text{NO}$	Óxido nítrico
$\bullet\text{NO}_2$	Dióxido de nitrogênio
ONOO ⁻	Peróxinitrito
O ₂	Oxigênio molecular
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
OH $\bullet$	Radical hidroxila
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	Tampão fosfato estéril
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
Primer S	<i>Primer sense</i>
Primer AS	<i>Primer anti-sense</i>
PSA	Persulfato de amônio

PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
rcTcOYE	<i>Old yellow enzyme</i> citosólica recombinante de <i>T. cruzi</i>
rcTcSOD	Superóxido dismutase mitocondrial recombinante de <i>T. cruzi</i>
rmTcTXNPx	Triparedoxina peroxidase mitocondrial recombinante de <i>T. cruzi</i>
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SAB	Soro albumina bovina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TBS	Tampão tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

SUMÁRIO

RESUMO	VII
RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA (ABSTRACT).....	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
 1 INTRODUÇÃO	 17
1.1 Ciclo biológico e morfologia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2 Epidemiologia da doença de Chagas.....	21
1.3 Diversidade genética de <i>T. cruzi</i>	22
1.4 Tratamento	23
1.5 Metabolismo oxidativo e prováveis proteínas de resistência ao estresse oxidativo	24
1.5.1 Triparedoxina peroxidase	27
1.5.2 Superóxido dismutase	28
1.5.3 <i>Old yellow enzyme</i>	28
1.6 Novas substâncias anti <i>T. cruzi</i>	29
 2 OBJETIVOS.....	 33
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 35
Fluxograma.....	36
3.1 Meio de cultura, soluções e géis	37
3.2 Cultivo de parasitos.....	39
3.3 Avaliação de suscetibilidade às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno em <i>T. cruzi</i> e toxicidade em células de mamíferos HepG2	39
3.4 Clonagem e produção de proteínas recombinantes.....	41
3.5 Purificação das proteínas recombinantes	43
3.6 Produção de anticorpos policlonais.....	43
3.7 Período de exposição às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno	44
3.8 Indução da expressão das enzimas das cepas de <i>T. cruzi</i> tratadas com as estruturas derivadas de diaminas do ferroceno	45

3.9 Obtenção dos extratos totais de proteínas das cepas de <i>T. cruzi</i>	46
3.10 Quantificação de proteínas	47
3.11 Western blotting	47
 4 RESULTADOS	 49
4.1 Avaliação de suscetibilidade das cepas de <i>T. cruzi</i> às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno e suas toxicidades em HepG2	50
4.2 Purificação de proteínas recombinantes	51
4.3 Obtenção de anticorpos policlonais	52
4.4 Curvas de crescimento e tratamentos das cepas de <i>T. cruzi</i>	53
4.5 Expressão das enzimas após exposição aos derivados de diaminas do ferroceno e benzonidazol	54
 5 DISCUSSÃO	 65
 6 CONCLUSÕES	 74
 7 REFERÊNCIAS.....	 77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo biológico e morfologia de *Trypanosoma cruzi*

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas descrita em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) é uma zoonose que se estende dos Grandes Lagos na América do Norte até o sudeste da Patagônia, endêmica das Américas, ocorre amplamente na América Latina (JANNIN; VILLA, 2007; SCHMUNIS, 2007).

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (JANNIN; VILLA, 2007; SCHMUNIS, 2007), ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (BHATIA et al., 2009) da qual fazem parte *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, caracterizada pela presença de um único flagelo e mitocôndria que contém o cinetoplasto (TEIXEIRA et al., 2012).

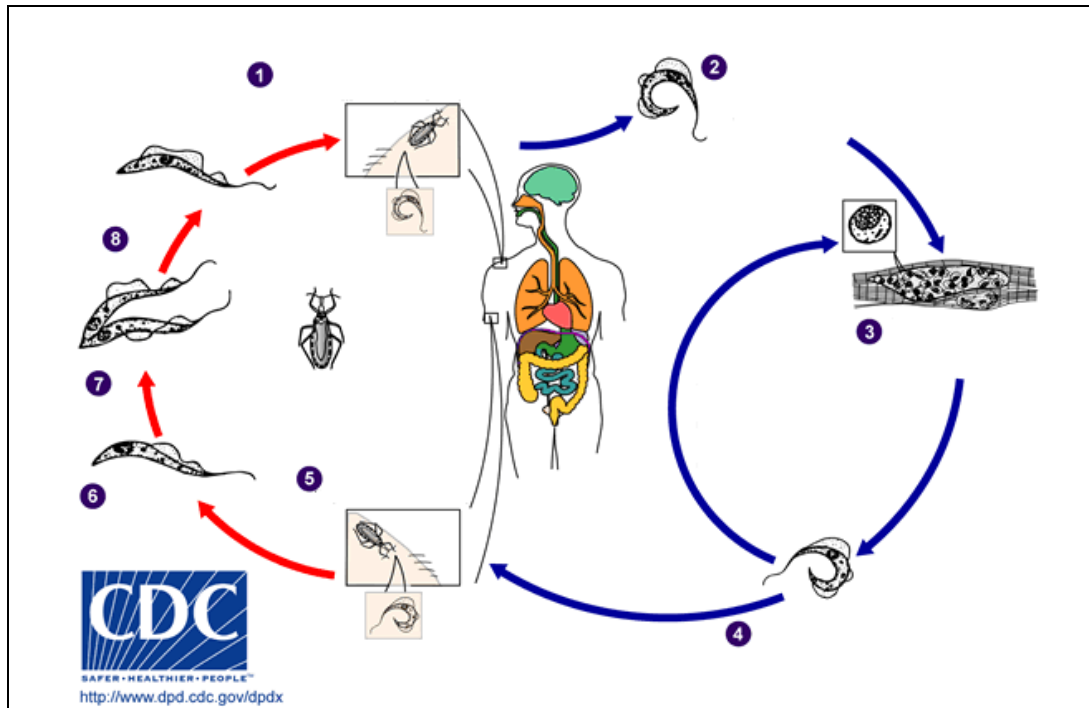
O ciclo de vida do parasito alterna entre vertebrados das Ordens Marsupialia, Edentata, Chiroptera, Rodentia, Artiodactyla, Carnivora e Primates (HOARE, 1972; DIAS, 2005; JANSEN; ROQUE, 2010) e insetos vetores hematófagos da família Reduviidae, os principais gêneros são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e o *Rhodnius* (GOURBIÈRE et al., 2012).

As variações morfológicas e o ciclo de vida (Figura 1) se devem a uma adaptação aos distintos habitats e situações biológicas pelos quais passa o parasito (DIAS, 2005).

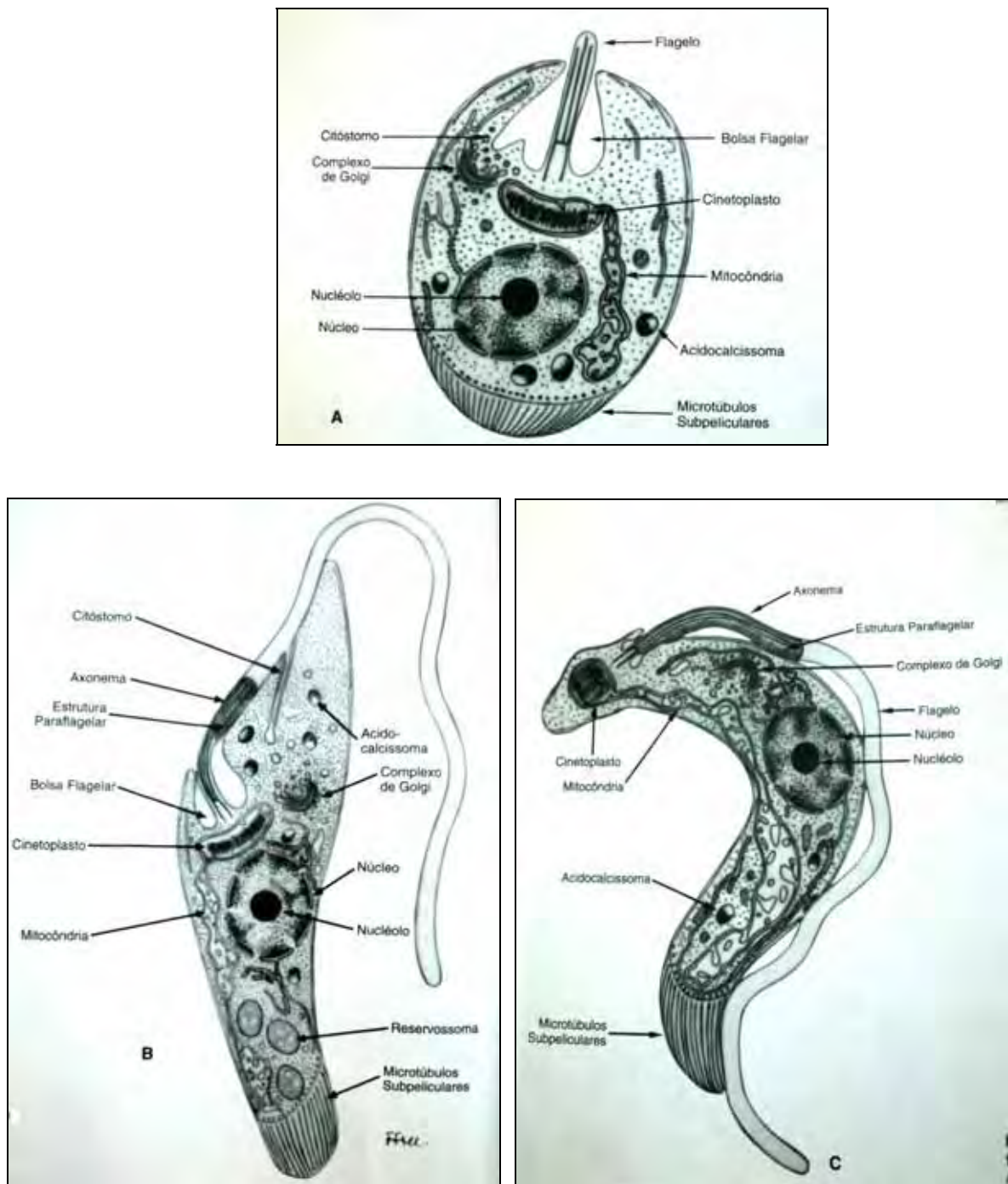
As formas amastigotas (Figura 2A) apresentam o núcleo grande, circular e excêntrico. As formas epimastigotas (Figura 2B) apresentam o cinetoplasto anterior ao núcleo e o flagelo emerge na extremidade anterior do parasito. As formas tripomastigotas (Figura 2C) possuem a membrana ondulante e o cinetoplasto posicionado entre o núcleo e a região posterior (DE SOUZA, 2000).

A transmissão da enfermidade pode ser por meio de vetores, via transfusão sanguínea, via congênita, por transplante de órgãos ou acidental (geralmente em laboratórios ou em cirurgias de pacientes infectados) (RIBEIRO et al., 1987; DIAS, 2005) e oral por alimentos e bebidas contaminados (STEINDEL et al., 2008; BASTOS et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Figura 1: Ciclo biológico do protozoário *T. cruzi*. (1) Triatomíneo ao se alimentar defeca próximo ao local da picada. (2) Tripomastigotas invadem células do hospedeiro vertebrado. (3) Amastigotas multiplicam-se no interior das células dos tecidos infectados. (4) Amastigotas se transformam em tripomastigotas que são liberados para o sangue com o rompimento da célula hospedeira; esses tripomastigotas reiniciam uma nova infecção nos tecidos. (5) Triatomíneo ao se alimentar contamina-se com os tripomastigotas presentes no sangue. (6) Tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino do inseto. (7) Epimastigotas multiplicam-se no intestino do inseto. (8) Epimastigotas transformam-se em tripomastigotas.



Fonte: Modificado de *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern* - Center for Disease Control and Prevention (DPDx - CDC). Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>>. Acesso em: 06 julho 2013.

Figura 2: Morfologia de *T. cruzi*. (A) amastigota, (B) epimastigota e (C) tripomastigota.

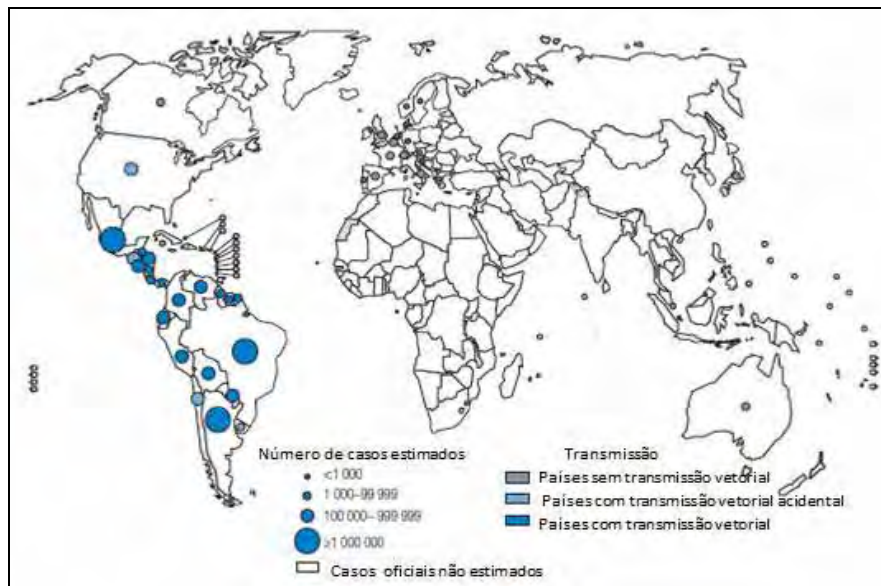
Fonte: De Souza, 2000.

1.2 Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas faz parte das doenças tropicais negligenciadas (ascaridíase, ancilostomíase, tricuriase, filariose linfática, oncocercose, dracunculiasis, esquistossomose, tripanossomíase africana, leishmaniose, úlcera de Buruli, lepra e tracoma) que acometem pessoas de baixa renda de países com economia periférica (HOTEZ et al., 2007).

O número de pessoas infectadas no mundo é estimado em 10 milhões, e a maioria ocorre na América Latina (Figura 3) - Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela e Uruguai. Mais de 25 milhões de pessoas estão sob o risco de contraírem a doença. A estimativa em 2008 de pessoas mortas foi maior que 10.000 (WHO, 2010). Movimentos migratórios levaram *T. cruzi* para regiões onde não ocorrem o vetor, como Canadá, Japão, Austrália, Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido, Suíça, Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia. Nessas regiões a transmissão ocorre por transfusão de sangue, vertical da mãe para a criança, transplante de órgãos e acidentes em laboratórios (COURA; VIÑAS, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Figura 3: Distribuição mundial da enfermidade 2006-2009.

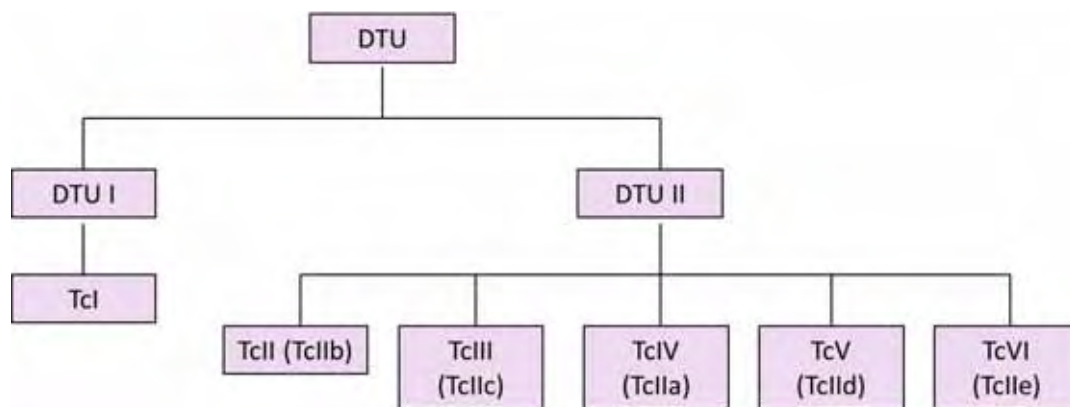


Fonte: Modificado de WHO, 2010.

1.3 Diversidade genética de *T. cruzi*

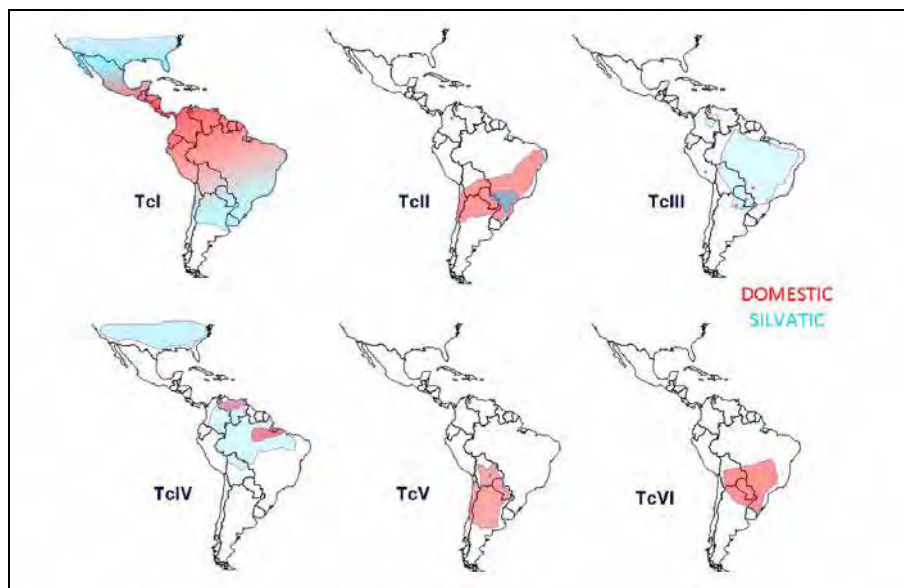
A classificação de *T. cruzi* baseada em genotipagem multilocus apresenta seis distintas DTUs (*discrete typing units*) divididas em duas grandes subdivisões, denominadas DTU I e DTU II (Figura 4). Uma DTU pode ser considerada como um grupo que apresenta similaridade entre si geneticamente em relação ao outro grupo, identificados por marcadores moleculares (ZINGALES et al., 2012), como o domínio divergente D7 do gene 24Sα rRNA (LSU rDNA) e a região intergênica não transcrita do mini éxon SL-RNA (LEWIS et al., 2009). O grupo DTU I é conhecido como TcI, enquanto DTU II é composto por IIa, IIb, IIc, IId e IId, também conhecidos por TcIV, TcII, TcIII, TcV e TcVI, respectivamente (ZINGALES et al., 2009).

Figura 4: Classificação das populações de *T. cruzi* em DTU.



Fonte: Autor.

TcI pode ser associado com ciclos silvestres e domésticos e com a cardiomiopatia chagásica. A infecção humana com TcI está concentrada nas regiões norte da América do Sul e América Central (Figura 5). TcII é encontrado predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul. A maioria dos isolados de TcII é proveniente do ciclo doméstico. TcIII está principalmente associado com o ciclo silvestre, abrange o oeste da Venezuela ao Chaco, na Argentina. TcIV parece apresentar uma similar distribuição de TcIII na América do Sul, com exceção do Chaco. TcV ocorre maior frequência na Argentina, Bolívia e Paraguai, e TcVI no Chaco. No cone sul, onde ocorre o predomínio de chagásicos portadores de TcII, TcV e TcVI, a cardiopatia é severa e pode ocorrer conjuntamente com megaesôfago e megacólon (ZINGALES et al., 2012).

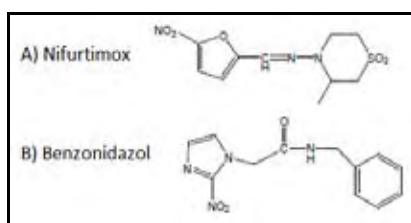
Figura 5: Distribuição geográfica de *T. cruzi* em DTUs nos ciclos silvestres e domésticos.

Fonte: Zingales et al., 2012.

1.4 Tratamento

Os únicos medicamentos prescritos para tratar a enfermidade são nifurtimox (NF), 5-nitrofuran (3-methyl-4-5'-nitrofurfurylideneamine) tetrahydro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide (Figura 6A), e benzonidazol (BZ), 2-nitroimidazole (N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide) (Figura 6B) (COURA; CASTRO, 2002; URBINA, 2010). Desde a década de 80, a comercialização de NF foi descontinuada, primeiro no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai (COURA; CASTRO, 2002), porém tem sido utilizado na América Central (SOEIRO; DE CASTRO, 2011).

Figura 6: Estruturas químicas do nifurtimox e benzonidazol.



Fonte: Modificado de Urbina; Docampo, 2003.

O modo de ação do NF, derivado de nitrofurano, envolve a geração de radical nitroânion por nitroredutases que, na presença de oxigênio, deixa intermediários reativos. BZ, derivado de nitroimidazol, interfere diretamente na síntese de macromoléculas pelo *T. cruzi* e

vários componentes celulares. A ação do BZ parece envolver ligações covalentes ou outras interações de intermediários nitroreduzores com componentes do parasito, ou ligações com DNA, lipídios e proteínas (COURA; CASTRO, 2002; MAYA et al., 2007). A produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença de Fe^{+3} , forma o radical livre de hidroxila ($OH^{\bullet}$) (MAYA et al., 2007).

Ambos os medicamentos têm significantes efeitos colaterais, provavelmente como consequência do dano oxidativo ou redutor nos tecidos dos hospedeiros. Entre os efeitos colaterais, podem ser observados anorexia, vômito, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica, em alguns casos isso pode levar à descontinuidade do tratamento (URBINA; DOCAMPO, 2003).

A ação desses medicamentos é muito limitada, a cura depende da fase da doença, da suscetibilidade da cepa e das condições fisiológicas do hospedeiro (COURA; CASTRO, 2002) e seus usos são problemáticos em imunodeprimidos e pacientes com HIV (CORTI; VILLAFANE, 2010; DE ALMEIDA et al., 2011; BERN, 2012). Além do mais apresentam baixa penetração em tecidos e meia-vida relativamente curta (URBINA, 2010). A alta variabilidade genética (DEVERA et al., 2003; LEWIS et al., 2009; ZINGALES et al., 2009) tem sido relacionada com casos de resistência aos nitros derivados, considerada um importante fator na baixa taxa de cura no tratamento (VELOSO et al., 2001).

Além da falta de diversidade de fármacos, também não há disponível uma vacina (QUIJANO-HERNANDEZ; DUMONTEIL, 2011). Um dos problemas que dificulta na obtenção de uma vacina é a alta variabilidade de glicosilfostadilinositol (GPI) glicoproteínas ancoradas de superfície de membrana (FERGUSON, 1997; DOS REIS, 2011). Podem alterar a resposta de macrófagos (DE DIEGO et al., 1997) e induzir linfócitos a apoptose, bem como mimetizar receptores das células do hospedeiro (GUTIERREZ et al., 2009).

1.5 Metabolismo oxidativo e prováveis proteínas de resistência ao estresse oxidativo

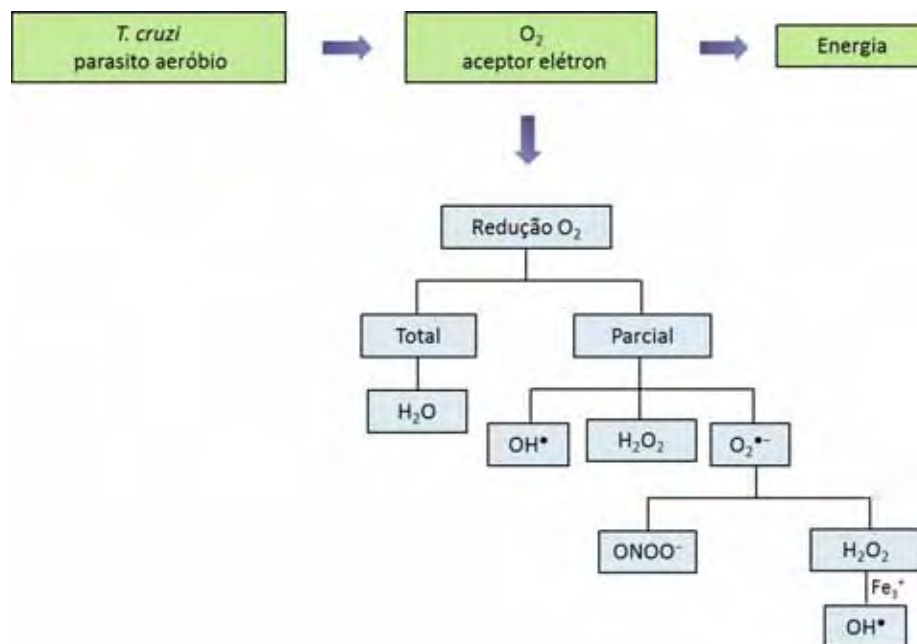
Células aeróbias vivem em ambientes oxigenados. O metabolismo aeróbio utiliza oxigênio molecular como aceptor de elétron na produção de energia por via oxidativa, na qual ocorre redução do oxigênio, ao receber quatro elétrons, e com isso é produzida moléculas de água. Entretanto, o oxigênio molecular pode ser parcialmente reduzido a espécies relativamente estáveis ao receberem um, dois ou três elétrons, com isso são formados ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, respectivamente (Figura 7). Esses

também podem ser produzidos em processos de atividade antimicrobiana e sinalização celular.

O ânion superóxido por si só não é muito reativo, o problema é que esse radical é o precursor de dois fortes oxidantes. Superóxido pode reagir com óxido nítrico e produzir peróxinitrito, agente oxidante e nitrante. Superóxido também é o precursor de peróxido de hidrogênio. Por isso o ânion superóxido atua indiretamente na formação do radical hidroxila, um oxidante não específico que ataca qualquer biomolécula, dado que peróxido de hidrogênio em presença de metal de transição (por exemplo, ferro) é responsável pela geração do radical hidroxila (TURRENS, 2004).

O peróxido de hidrogênio pode se difundir facilmente por meio de membranas celulares, como a membrana nuclear. O radical hidroxila eletrofílico ataca bases nitrogenadas e desoxirribose, o que conduz à ruptura da cadeia de DNA. No caso de proteínas e aminoácidos, o radical hidroxila reage com a cadeia lateral desses. O ataque aos aminoácidos que compõem as proteínas pode gerar clivagens de ligações, com isso ocorre perda da atividade enzimática e dificuldade no transporte ativo pelas membranas celulares. A oxidação de lipídios, como os ácidos graxos, pelo radical hidroxila interfere no transporte ativo e passivo pela da membrana, também pode ocasionar a ruptura da célula, o que conduz à morte celular (BARREIROS et al., 2006).

Figura 7: Produção de espécies reativas de oxigênio a partir da redução do oxigênio.



Fonte: Autor.

T. cruzi é um parasito intracelular aeróbio, por isso tem de evadir não somente as espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas endogenamente pela via respiratória, como também tem que se defender das produzidas pelo sistema imune do hospedeiro (MÜLLER et al., 2003). Interações entre os parasitos e as células dos hospedeiros mamíferos são cruciais para a disseminação dos parasitos e o estabelecimento da infecção. Macrófagos são células-chaves no controle da infecção, produzem óxido nítrico sintase (iNOs), responsável pela geração de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$). O óxido nítrico ao reagir com ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) produz peróxinitrito (ONOO^-), forte oxidante que atua contra o parasito. O peróxinitrito por sua vez está relacionado com a geração de radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) e radicais de carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) que podem oxidar lipídios e DNA, bem como participar na oxidação e nitração de proteínas (PIACENZA et al., 2009b). A nitração de proteínas pode conduzir a degradação por proteases através de proteossomos (GUPTA et al., 2009).

O sistema antioxidante de *T. cruzi* depende de NADPH que é distribuído para uma variedade de vias enzimáticas detoxificadoras por meio de tripanotiona ditiol [$\text{T}(\text{SH})_2$, N^1, N^8 -bisglutathionylspermidine] e tioredoxina. Apresenta cinco peroxidases que diferem em suas localizações subcelulares e especificidade de substratos. Glutathione peroxidase-I localiza-se no citosol e glicossoma, enquanto que glutathione peroxidase-II ocorre no retículo endoplasmático, atuam contra hidroperóxidos e hidroperóxidos-lipídicos, respectivamente. Tripanredoxina peroxidase mitocondrial e citosólica que detoxificam peróxinitrito, peróxido de hidrogênio e pequenas cadeias orgânicas de hidroperóxidos. Ascorbate dependente de heme-peroxidase, ocorre no retículo endoplasmático, apresenta ação contra peróxido de hidrogênio. Outras enzimas que atuam contra agentes oxidantes são superóxidos dismutases, ocorrem no citosol, mitocôndria e glicossoma, atuam na detoxificação de superóxido (PIACENZA et al., 2012).

Um melhor entendimento dos mecanismos de defesa de *T. cruzi* contra o estresse oxidativo poderia contribuir na busca por novos alvos e no desenvolvimento de novos fármacos mais específicos (STEENKAMP, 2002; TURRENS, 2004; IRIGOÍN et al., 2008; PIACENZA et al., 2012). Por isso é importante a identificação de genes que são expressos de modo diferencial em populações de *T. cruzi* suscetível e resistente (MURTA et al., 2008). Estudos relatam uma elevação no nível de expressão de algumas proteínas em cepas resistentes, quando tratadas com BZ (MURTA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2009), como calpaína, cisteína peptidase, tirosina aminotransferase, peroxiredoxina, superóxido dismutase, glutamato desidrogenase, *nucleoside diphosphate kinases* e *old yellow enzyme* (ANDRADE et al., 2008).

1.5.1 Triparedoxina peroxidase

Triparedoxina peroxidase (TXNPx) é uma peroxidase que utiliza triparedoxina, membro da superfamília tioredoxina, como fonte doadora de elétron para remover peróxidos. TXNPx é um membro da ubíqua família de peroxiredoxinas, que não apresentam grupo prostético ou íon metálico ligado (CASTRO; TOMÁS, 2008).

Em *T. cruzi*, TXNPx caracteriza-se por conter dois domínios conservados de cisteínas redutoras ativas típica 2-Cys. Apresenta atividade peroxidase cuja função principal é a proteção contra os danos causados por peróxidos, levando à redução dos mesmos. A enzima também catalisa a redução de pequenas cadeias de hidroperóxidos orgânicos a álcool e também apresenta atividade peroxinitrito redutase (PIÑEYRO et al., 2005). Em tripanosomatídeos, TXNPx ocorre tanto na mitocôndria (mTcTXNPx) como no citosol (cTcTXNPx) (WILKINSON et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2009).

Para estabelecer a infecção, tripomastigotas metacíclicos devem invadir macrófagos e sobreviver às condições altamente oxidativas dentro do fagossomo. TXNPx apresentam um papel principal na minimização da formação de radicais derivados de peroxinitritos, como ânions de $\text{OH}^\bullet$, $\bullet\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\bullet-}$, o que confere proteção ao parasito (PIACENZA et al., 2008). Nos estudos do papel de mTcTXNPx e cTcTXNPx, na invasão e sucesso na infectividade, os tripomastigotas aumentam a expressão dessas enzimas, demonstrando um importante papel na sobrevivência, replicação e diferenciação de *T. cruzi* (formas infectivas para as replicativas) o que poderia constituir-se em fator de virulência (PIÑEYRO et al., 2008; PIACENZA et al., 2009a).

O nível de expressão de mTcTXNPx and cTcTXNPx foi aumentado em epimastigotas, cepas resistentes, expostos a peróxidos (WILKINSON et al., 2000), H_2O_2 (PIACENZA et al., 2009a) e BZ (NOGUEIRA et al., 2009).

Em *Leishmania donovani*, TXNPx mitocondrial protege da morte celular programada, atua na detoxificação e prevenção contra os danos às proteínas, DNA e lipídios causados por ERO. Em *L. infantum*, o aumento na expressão de TXNPx citosólica aumentou a resistência a H_2O_2 (HARDER et al., 2006).

1.5.2 Superóxido dismutase

Superóxido dismutases (SOD) são uma família ubíqua de enzimas que catalisam a dismutação de ânions superóxido (ZELKO et al., 2002). Remove o excesso de radical $O_2^{\bullet-}$ e o converte em O_2 e H_2O_2 (NOGUEIRA et al., 2006).

Todos os tripanosomatídeos apresentam SOD que contém co-fator metálico ferro (Fe) (IRIGOÍN et al., 2008). Existem quatro genes ou isoformas de SOD no genoma de *T. cruzi* (MATEO et al., 2008), sendo que dois deles foram caracterizados, mitocondrial (mTcSOD) e citosólica (cTcSOD) (IRIGOÍN et al., 2008).

Em formas epimastigotas de *T. cruzi*, o aumento no nível de expressão de mTcSOD ocasiona resistência ao estímulo de morte celular programada (PIACENZA et al., 2007).

Em tratamentos de epimastigotas, cepas de *T. cruzi* resistentes à violeta de genciana, foi demonstrado aumento na expressão de cTcSOD (TEMPERTON et al., 1998). Também houve aumento na expressão de mTcSOD ao expor os parasitos ao BZ (NOGUEIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008).

Em experimentos realizados com *Entamoeba histolytica*, resistentes ao metronidazol, o nível de expressão de SOD aumentou, indicando uma proteção do parasito as ações tóxicas do ânion $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (WASSMANN et al., 1999).

1.5.3 Old yellow enzyme

Old yellow enzyme (OYE) pertence à família das flavoenzimas (WILLIAMS; BRUCE, 2002). *Old yellow enzyme* é uma NADPH oxidoreductase que apresenta flavina mono nucleotídeo (FMN) como grupo prostético (MURTA et al., 2006). OYE tem sido identificada em leveduras, plantas e bactérias, porém, não em animais (KUBATA et al., 2002).

Em *T. cruzi*, OYE citosólica (cTcOYE) cataliza a síntese de prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ e reduz substâncias tripanossomicidas (KUBATA et al., 2002), naftoquinonas, como menadione e β -lapachone, nitroheterocíclicos, como nifurtimox e benzonidazol (KUBATA et al., 2002) e komaroviquinone (UCHIYAMA et al., 2005). Embora OYE atue na redução de compostos tripanossomicidas, como as naftoquinonas, ao mesmo tempo gera o ânion de radical superóxido (KUBATA et al., 2002). Estudos tem demonstrado que moléculas ligantes ao grupo flavina e que o inibem ocasionam a inibição da atividade enzimática de OYE (YAMAGUCHI et al., 2011).

Ainda não se sabe por que *T. cruzi* produz PGF2 α , também encontrada em *T. brucei*. Sabe-se que em mamíferos, prostaglandinas são mediadores de respostas fisiológicas e patológicas, como disfunção ovariana, aborto espontâneo, inflamação, febre e imunossupressão. Em *Schistosoma mansoni*, prostaglandina está associada com o processo da transformação da cercaria em esquistossômulos; enquanto que no protozoário *Amoeba proteus*, parece apresentar função sinalizadora durante a fagocitose, porque prostaglandinas induzem à formação de vacúolos (KUBATA et al., 2000).

Cepas de *T. cruzi* resistentes ao BZ aumentam o nível de expressão de cTcOYE quando expostas a esse fármaco (MURTA et al., 2006). Segundo dados publicados, a localização é citosólica, não foi descrita ainda se existe a forma mitocôndrial ou que esteja presente em outra organela (UCHIYAMA et al., 2005).

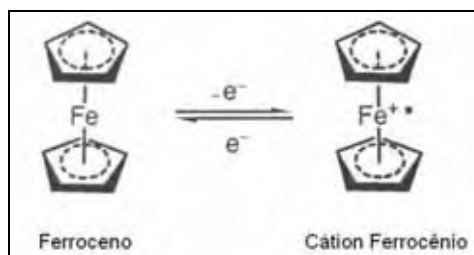
1.6 Novas substâncias anti *T. cruzi*

Existe um grande interesse no uso de metais de transição, em complexos organometálicos, nos medicamentos (BIOT et al., 1997). A química bioorganometálica envolve estudo da estrutura e a síntese de complexos organometálicos de importância biológica, sendo uma das mais promissoras áreas os organometálicos farmacêuticos (FISH; JAOUEN, 2003).

Tem se verificado que a adição de metais de transição na estrutura do fármaco pode acentuar sua atividade biológica (JAOUEN; VESSIÈRES, 1993; SHARMA; PIWNICAWORMS, 1999; SCHATZSCHNEIDER; METZLER-NOLTE, 2006).

Um desses metais é o ferroceno (VAN STAVEREN; METZLER-NOLTE, 2004). Ferroceno ou di(η^5 -ciclopentadienil) ferro (II) é um composto estável (BIOT et al., 1997), um metalloceno que apresenta um metal de transição posicionado perpendicularmente aos dois anéis aromáticos (ciclopentadienil, cicloheptatrienil ou benzeno). O ferroceno ao ser oxidado forma o cátion ferrocênio (Figura 8) que apresenta um elétron desapareado, assim o cátion pode ser considerado um típico radical livre (NEUSE, 2005). Sabe-se que o ferroceno pode ser oxidado por H₂O₂ em presença de peroxidase (EPTON et al., 1977).

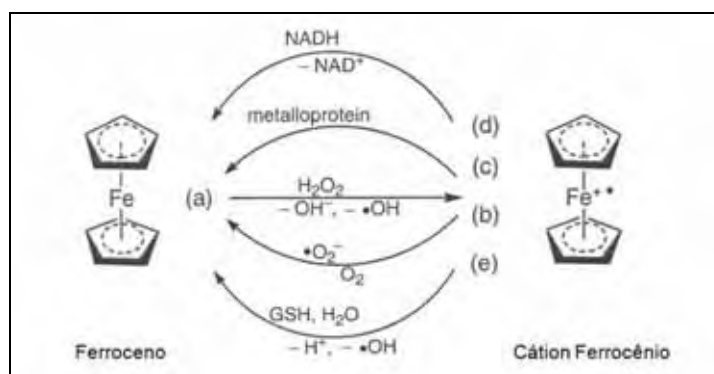
Figura 8: Estrutura do ferroceno e cátion ferrocênio.



Fonte: Modificado de Neuse, 2005.

O ferroceno pode ser oxidado por H_2O_2 em meio biológico (Figura 9a). A redução do cátion ferrocênio, em meio biológico, pode ocorrer por meio da ação controlada do pH do ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$, gerado fotoliticamente, ocorrendo a formação de oxigênio (Figura 9b); por meio da oxidação de metaloproteínas (Figura 9c), como plastocianina ou ferrocitocromo c; por meio da oxidação de NADH a NAD^+ (Figura 9d); ou por meio da geração de radical livre hidroxila na presença de glutathiona, GSH (Figura 9e) (NEUSE, 2005).

Figura 9: Reações de oxidação do ferroceno e redução do cátion ferrocênio.



Fonte: Modificado de Neuse, 2005.

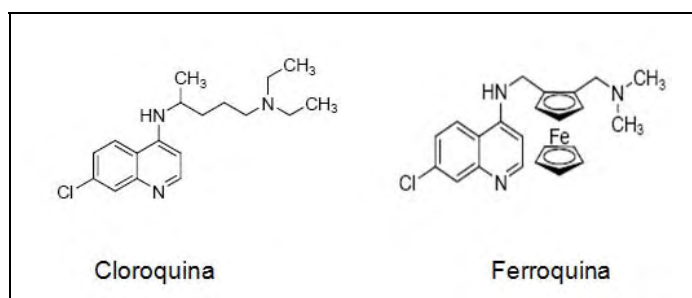
A reação da oxidação de dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) demonstra que o cátion ferrocênio está propenso a interferir em reações biológicas importantes controladas por enzimas, NADH atua como uma co-enzima para desidrogenases em processos biológicos de redução (NEUSE, 2005).

O cátion ferrocênio ao formar radical hidroxila pode danificar o DNA, sendo responsável pelos efeitos citotóxicos. Embora o mecanismo preciso da citotoxicidade seja desconhecido, pode-se sugerir que o ferroceno não afete o DNA diretamente e que o ataque é devido à formação de ERO formadas na redução do cátion ferrocênio (NEUSE, 2005).

A atividade citotóxica de fármaco contra células do câncer de mama foi melhorada com a adição do ferroceno (NEUSE, 2005; HILLARD et al, 2006; HEILMANN et al., 2008), esse aumento citotóxico também foi verificado para células de micobactéria, *Mycobacterium tuberculosis* (RALAMBOMANANA et al., 2008).

Dado que a adição de metais de transição na estrutura do fármaco pode acentuar sua atividade biológica (JAOUEN; VESSIÈRES, 1993), adicionou-se ferroceno na cloroquina formando a ferroquina (Figura 10) e verificou-se aumento da citotoxicidade para cepas de *Plasmodium spp.* resistentes a cloroquina (BIOT et al., 1997; DOMARLE et al., 1998; DELHAES et al., 2001).

Figura 10: Estruturas dos antimaláricos cloroquina e ferroquina.



Fonte: Modificado de Dubar et al., 2008.

O grupo cloroquinolina ligado a ferroceno e a diamina foi utilizado para a síntese de estruturas derivadas de diaminas do ferroceno pela equipe da professora Dra. Maria Domingues Vargas - Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense (UFF). A síntese de derivados de diaminas do ferroceno baseou-se no fato de que ferroquina, apresenta grupo cloroquinolina ligado a ferroceno, mostrou atividade citotóxica maior que cloroquina em cepas de *Plasmodium sp.* resistentes a cloroquina.

Dado ao exposto, este trabalho analisou as diferenças de suscetibilidade em seis cepas de formas epimastigotas de *T. cruzi* aos derivados de diaminas do ferroceno (substâncias AAC04, AAC09 e AAC10 que são estruturas inéditas), cedidos pela profa. Dra. Maria Vargas. Realizou-se a avaliação da expressão das proteínas de defesa celular antioxidativas - (mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE) relacionadas com o aumento na resistência a substâncias tripanossomicidas. Também foram realizadas análises com benzonidazol como parâmetro de comparação às respostas de *T. cruzi* aos derivados de diaminas do ferroceno.

O laboratório trabalha com a forma epimastigota por ser de fácil manipulação e baixo custo de manutenção. Existem dados na literatura com as formas epimastigotas e

tripomastigotas relacionados com as proteínas do metabolismo oxidativo (ANDRADE et al., 2008; PIACENZA et al., 2009a), nos quais as cepas resistentes, de ambas as formas, expressam em maior quantidade tais proteínas. Assim, acredita-se que os resultados obtidos no presente estudo com epimastigotas podem ser similares em formas tripomastigotas.

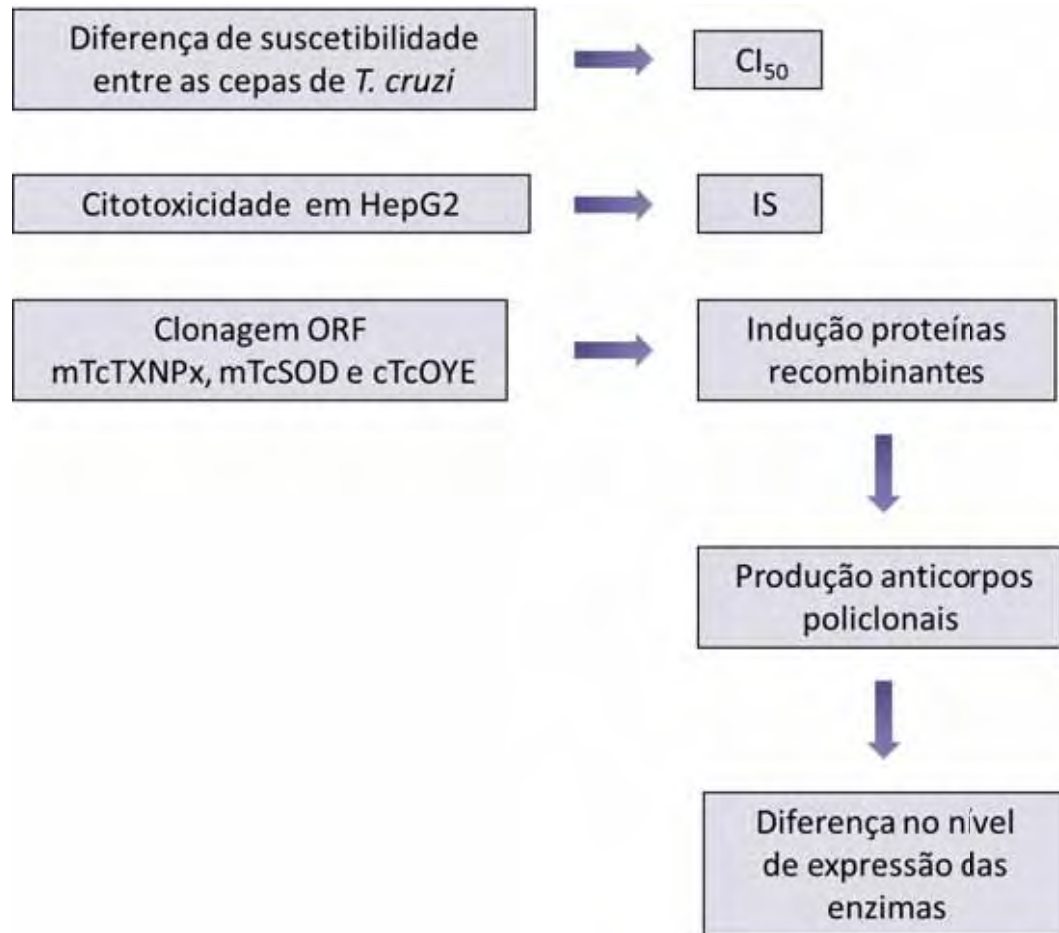
OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

No intuito de verificar a possível ação dos derivados de diaminas do ferroceno no metabolismo oxidativo, relacionado com a expressão das enzimas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE, tidas como fatores de resistência a espécies reativas de oxigênio, o presente estudo avaliou a suscetibilidade das formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi* a esses derivados e a diferença na expressão dessas enzimas. Também foram analisados tratamentos com benzonidazol. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram abordados:

- 2.1 Avaliação de suscetibilidade às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno (substâncias AAC04, AAC09 e AAC10) nas formas epimastigotas de cepas de *T. cruzi* (Y, Bolívia, SI1, SIGR3, SI8 e QMII);
- 2.2 Avaliação da citotoxicidade dos derivados de diaminas do ferroceno em HepG2, modelo *in vitro* de célula de mamífero;
- 2.3 Purificação de proteínas recombinantes rmTcTXNPx, rmTcSOD e rcTcOYE;
- 2.4 Produção de anticorpos policlonais anti mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE;
- 2.5 Obtenção de extratos totais de *T. cruzi* após tratamentos com os derivados de diaminas do ferroceno;
- 2.6 Avaliação por *Western blotting* do nível de expressão das proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE presentes nos extratos totais das cepas de *T. cruzi* tratadas e não tratadas com estruturas derivadas de diaminas do ferroceno.

**MATERIAIS E
MÉTODOS**

FLUXOGRAMA

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meio de cultura, soluções e géis

Meio LIT (*liver infusion tryptose*):

68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄ ; 111 mM dextrose; 0,3% *liver infusion broth* (Invitrogen); 0,5% *tryptose*. Dissolver com água destilada. Acertar pH 7,2 com HCl. Autoclavar a 121 °C por 20 min e 1 atm. Esperar esfriar o meio à temperatura ambiente e adicionar 10% soro fetal bovino inativado (Gibco) e 1% de 2,5 mg/mL *haemin* (Sigma), previamente dissolvido em 50 mM NaOH e filtrado com filtro de 0,22 µm (TPP).

Corante Coomassie brilliant blue R-250:

0,1% Coomassie brilliant blue; 40% etanol; 10% de acético glacial

Descorante:

40% etanol; 10% ácido acético glacial

DAB:

1 mg/mL DAB; 0,05 M Tris-HCl pH 8,0

MTT e PMS:

2,5 mg/mL MTT (Sigma); 0,22 mg/mL PMS (Sigma)

SDS-PAGE 15% (gel de separação):

5% acrilamida+40% bis-acrilamida; 12,7% de 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS 10%; 0,1% PSA 10% (Sigma); 0,1% TEMED (GE Healthcare)

SDS-PAGE 10% (gel de separação):

5% acrilamida+40% bis-acrilamida; 12,7% de 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS 10%; 0,1% PSA 10%; 0,1% TEMED

SDS-PAGE 5% (gel de empilhamento):

5% acrilamida+40% bis-acrilamida; 12,7% de 1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS 10%; 0,1% de PSA 10%; 0,1% TEMED

Luminol:

15 mg/mL ácido p-cumárico (diluído em DMSO); 44 mg/mL luminol (diluído em DMSO); 10% de 1M Tris-HCl pH 8,5

Tampão de amostra (acompanhar amostra na eletroforese):

125 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS 10%; 25% glicerol; 2,5 mg/mL azul de bromofenol; 250 mM DTT

Tampão de transferência:

48 mM Tris; 39 mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol

Tampão para extrato total:

7 M uréia; 2 M thiouréia; 40 mM Tris; 4% CHAPS (Sigma); 0,1 mg/mL PMSF (previamente dissolvido em isopropanol); 2 µg/ mL pepstatina, 10 µg/mL leupeptina e 10 µg/mL aprotinina

Tampão PBS:

130 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄

Tampão TBS:

50 mM Tris; 150 mM NaCl

Tampão tris glicina:

5 mM Tris; 50 mM glicina; 0,02% SDS 10%

Tampão tris wash:

100 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5

Tampões para purificação de proteínas recombinantes:

Tampão de solubilização: 6 M uréia; 50 mM Tris pH 8,0; 2 mM DTT

Tampão de lavagem: 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0; 300mM NaCl; 20mM imidazol; 6 M uréia

Tampão de eluição: 50mM NaH₂PO₄ pH 8,0; 300mM NaCl; 500 mM imidazol; 6 M uréia

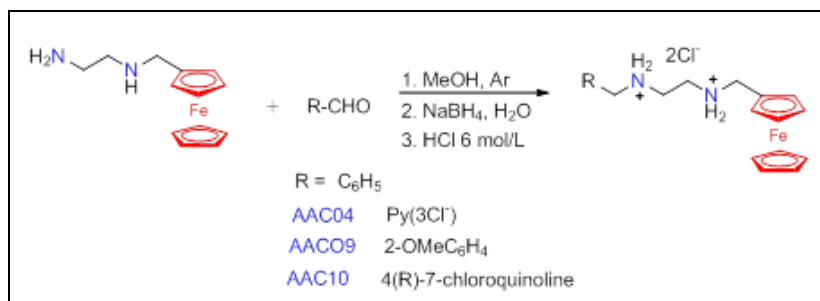
3.2 Cultivo de parasitos

As formas epimastigotas de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho foram as cepas Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953), Bolívia (FUNAYAMA; PRADO JUNIOR, 1974), Santo Inácio 1 (ROSA et al., 2004), Quaraí II (MARTINS et al., 2008), Santo Inácio 3 e Santo Inácio 8 (RIMOLDI et al., 2012). Todas foram cultivadas a 28 °C em meio LIT - *liver infusion tryptose* (FERNANDES; CASTELLANI, 1966), suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (Invitrogen). As cepas Santo Inácio 1, 3 e 8 e Quaraí II foram cedidas gentilmente pelo professor Dr. João Aristeu da Rosa - Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP).

3.3 Avaliação de suscetibilidade às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno em *T. cruzi* e toxicidade em células de mamíferos HepG2

A técnica colorimétrica do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; Sigma), desenvolvida por Mosmann em 1983 e modificada por Cotinguiba et al. (2009) para ensaios citotóxicos *in vitro* com formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi utilizada para os testes de suscetibilidade às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno, denominadas substâncias AAC04, AAC09 e AAC10 (Figura 11).

Figura 11: Síntese dos derivados de diaminas do ferroceno.

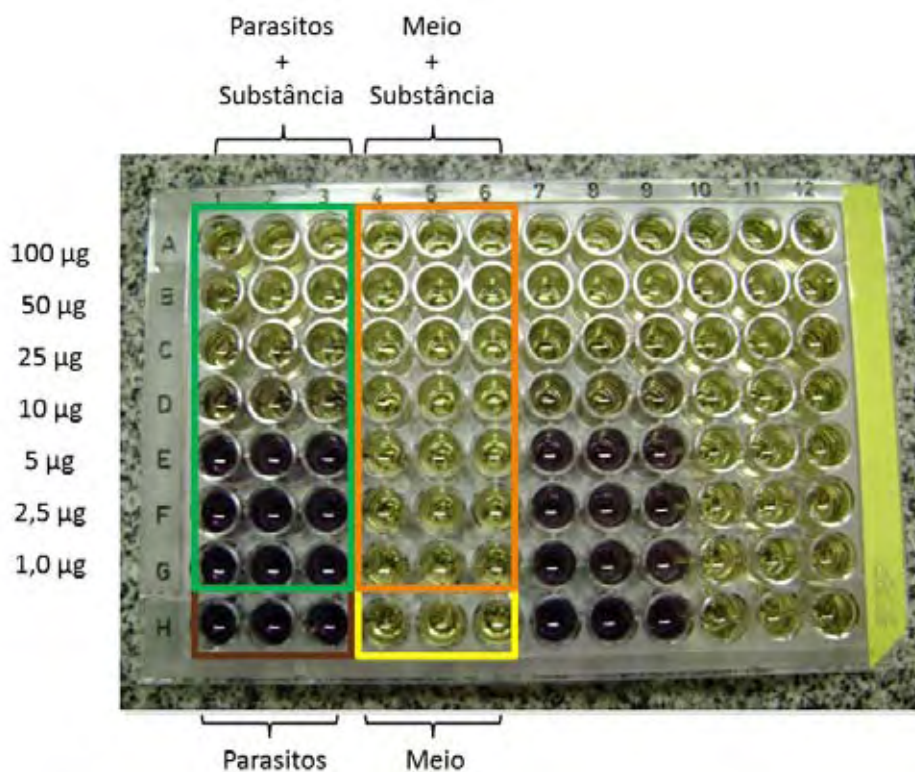


Fonte: Modificado de Francisco, A. I. et al. (dados não publicados).

O sal MTT é reduzido a formazan (forma um precipitado roxo) pela ação da succinato desidrogenase, presente na mitocôndria de célula viável; assim quanto mais escura estiver a solução, maior a viabilidade celular ou a atividade metabólica (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

Os testes foram realizados em triplicata numa placa de poliestireno de 96 poços (placa ELISA). Os testes iniciaram-se com culturas na fase log de crescimento, 1.10^7 parasitos/mL, contagem feita em câmara de Neubauer. As substâncias AAC04, AAC09 e AAC10 e BZ (*N*-benzyl-2-nitro 1*H*-imidazol-1-acetamide; Sigma) estoques a 20 mg/mL foram diluídos em DMSO (*dimethylsulfoxide*; Sigma) para as concentrações desejadas. São feitos três controles: meio mais substância, somente parasitos e somente meio (Figura 12). A partir dos valores de absorbância, leitura a 595 nm em espectrofotômetro (Microplate Reader 550; BioRad), foram obtidas as porcentagens de *T. cruzi* mortos, a partir dessas porcentagens foram calculados os valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀) de acordo com Cotinguiba et al. (2009). Para o cálculo empregou-se o programa Origin 7.0 (WASS, 2002), com isso foram obtidos os valores de CI₅₀ das estruturas derivadas de diaminas do ferroceno.

Figura 12: Ensaio citotóxico com as formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi*.



Fonte: Autor.

As células derivadas de hepatoma humano, HepG2, simulam funções detoxificadoras de hepatócitos (JAVITT, 1990), por isso tem sido utilizada em estudos sobre a ação citoprotetora a agentes tóxicos e as vias metabólicas de fármacos (WILKENING et al., 2003; MERSCH-SUNDERMANN, 2004).

Foram utilizadas as células HepG2, modelo *in vitro* de células de mamíferos, para avaliar a citotoxicidade dos derivados de diaminas do ferroceno. A partir dos valores de CI_{50} para HepG2 foi avaliado o Índice de Segurança (IS) das substâncias AAC04, AAC09, AAC10 para células de mamíferos. Também foi calculado o valor de IS para benzonidazol para comparar a toxicidade. Essa parte do trabalho foi realizada em colaboração com a equipe da professora Dra. Vera Lúcia Isaac - Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP). O protocolo utilizado foi o descrito por Chiari et al. (2012). Para o cálculo do IS foi considerado apenas os valores de CI_{50} obtidos para a cepa Y, cepa padrão, como demonstrado abaixo:

$$IS = CI_{50} \text{ HepG2} / CI_{50} \text{ T. cruzi (cepaY)}$$

3.4 Clonagem e produção de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho foram obtidas durante o trabalho de iniciação científica de Kohatsu (2011) realizado no laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), sob a orientação da professora Dra. Regina Cicarelli.

Para a obtenção das proteínas recombinantes foram amplificadas ORF (*open reading frame*) das sequências que se encontram no GenBank, os números de acesso são: CAA06923 (mTcTXNPx), AAX84936 (mTcSOD) e U31282 (cTcOYE). Para a amplificação foram utilizados *primers* específicos (Tabela 1) construídos com o auxílio dos programas Gene Runner V 3.05 (NICHOLAS; NICHOLAS, 1997) e NEB Cutter V 2.0 (VINCZE et al., 2003). As sequências apresentam na extremidade da região 5' sítio de restrição para a enzima *NdeI* (BioLabs) e *HindIII* (Pharmacia Biotech), importantes para a realização da subclonagem.

Tabela 1: *Primers* utilizados para a amplificação das sequências nucleotídicas

Iniciador	Sequência dos oligonucleotídeos (sítio da enzima de restrição está sublinhado)	Enzima de restrição
mTcTXNPx-S	5'-ATCATATGTTTCGTCGTATGGCCGTG-3'	<i>NdeI</i>
mTcTXNPx-AS	5'-CGAAGCTTTCATGCGTTTTTCTCAAAATATTC-3'	<i>HindIII</i>
mTcSOD-S	5'-TTCATATGTTGAGACGTGCGGTG-3'	<i>NdeI</i>
mTcSOD-AS	5'-AAGCTTTCACAAAGTCCTTGTAGTACG-3'	<i>HindIII</i>
cTcOYE-S	5'-TACATATGGCGACGTTCCCTGAACTTC-3'	<i>NdeI</i>
cTcOYE-AS	5'-CTAAGCTTTACGTCGGGTAATCGTTGTATC-3'	<i>HindIII</i>

Fonte: Kohatsu, 2009.

As sequências das enzimas foram inseridas no vetor de clonagem pGEM-T *Easy System* (Promega) e sequenciadas em sequenciador automático *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems). As análises das sequências obtidas foram feitas por meio do BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), disponível no NCBI - *National Center of Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Dada à confirmação da clonagem, seguiu-se com a digestão por meio as enzimas *NdeI* e *HindIII*. Após purificação dos DNAs, as sequências foram inseridas em vetor de expressão pET28a (Novagen) e transformadas em *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. Esse vetor de expressão adiciona na região N-terminal das proteínas recombinantes uma cauda de 6 histidinas (His-tag). A His-tag auxilia na purificação das proteínas recombinantes ao interagir com o ligante (NiSO_4) da coluna de cromatografia.

A indução da expressão das proteínas recombinantes foi feita com 0,4 mM IPTG (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*; Sigma), a cultura foi incubada a 37 °C e sob agitação a 200 rpm *overnight*. A expressão e a solubilidade das proteínas foram verificadas por meio de gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970), corado com 0,1% *Coomassie brilliant blue* R-250 (Merck), e posteriormente descorado para a visualização das bandas. A expressão e a solubilidade também foram verificadas por meio de *Western blotting*, foi utilizado anticorpo monoclonal anti His conjugado a peroxidase 1:20.000 (Sigma) e a revelação feita com 1 mg/mL DAB (3,3'-*diaminobenzidinetetrahydrochloride*; Sigma). Para identificação do tamanho das proteínas foi utilizado marcador molecular (Precision Plus Protein Standards; BioRad).

Após a confirmação da expressão, procedeu-se à lise celular por sonicação pulsada (550 Sonic Dismembrator; Fisher Scientific), 5 s sonicando e 9 s de pausa num tempo total de 2 min. A seguir foi realizada centrifugação (4 °C por 15 min e 30.000 x g) para a separação

das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). Os clones positivos que continham a ORF em pET28a foram armazenados com glicerol a - 80 °C para usos posteriores.

3.5 Purificação das proteínas recombinantes

Os clones, contendo a ORF de mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE em pET28a, foram induzidos para a obtenção das proteínas recombinantes como descrito anteriormente. As proteínas recombinantes obtidas, por estarem em fração insolúvel, foram solubilizadas com tampão de solubilização. A seguir, procedeu-se a purificação das proteínas recombinantes, realizada por meio do cromatógrafo Äkta CLFP (Amersham Biosciences) segundo as especificações do fabricante. As frações obtidas foram analisadas em gel de SDS-PAGE 15% corado com 0,1% *Coomassie brilliant blue* R-250 (Merck), que foi em seguida foi descorado para a visualização das bandas. Para identificação do tamanho das proteínas foi utilizado marcador molecular (Precision Plus Protein Standards; BioRad).

Após a purificação das proteínas recombinantes, realizou-se a diálise. As membranas de diálise foram fervidas em 500 mL de água destilada por 5 min com 1 mM EDTA pH 8,0. A seguir as amostras foram acondicionadas nas membranas e deixadas em 1000 mL de solução tampão PBS sob leve agitação a 4 °C *overnight*. No caso das amostras provenientes de bandas recortadas dos géis, estes foram deixados a 4 °C por 15 min sob leve agitação em solução 0,25 M KCl, para a posterior excisão das bandas. Após a retirada das bandas, estas foram maceradas e ressuspensas com 2 mL de tampão de eluição da purificação, e a seguir prosseguiu-se com a diálise. Após a diálise, uma parte das amostras foi utilizada para a obtenção dos anticorpos policlonais, enquanto que a outra foi armazenada a - 80 °C para usos posteriores.

3.6 Produção de anticorpos policlonais

O protocolo utilizado e aprovado pela Comissão de Ética Para Uso de Animais - CEUA - (CEP/FCF/CAr nº 04/2011) consistiu em: utilizar três coelhos machos jovens (5 - 6 meses) para a indução da produção de anticorpos anti mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE. Para tanto, foram inoculados 200 µg/mL de cada proteína recombinante com adjuvante completo de Freund (BD Difco) por via intradérmica, na proporção V:V. Aos 15 e 30 dias da primeira

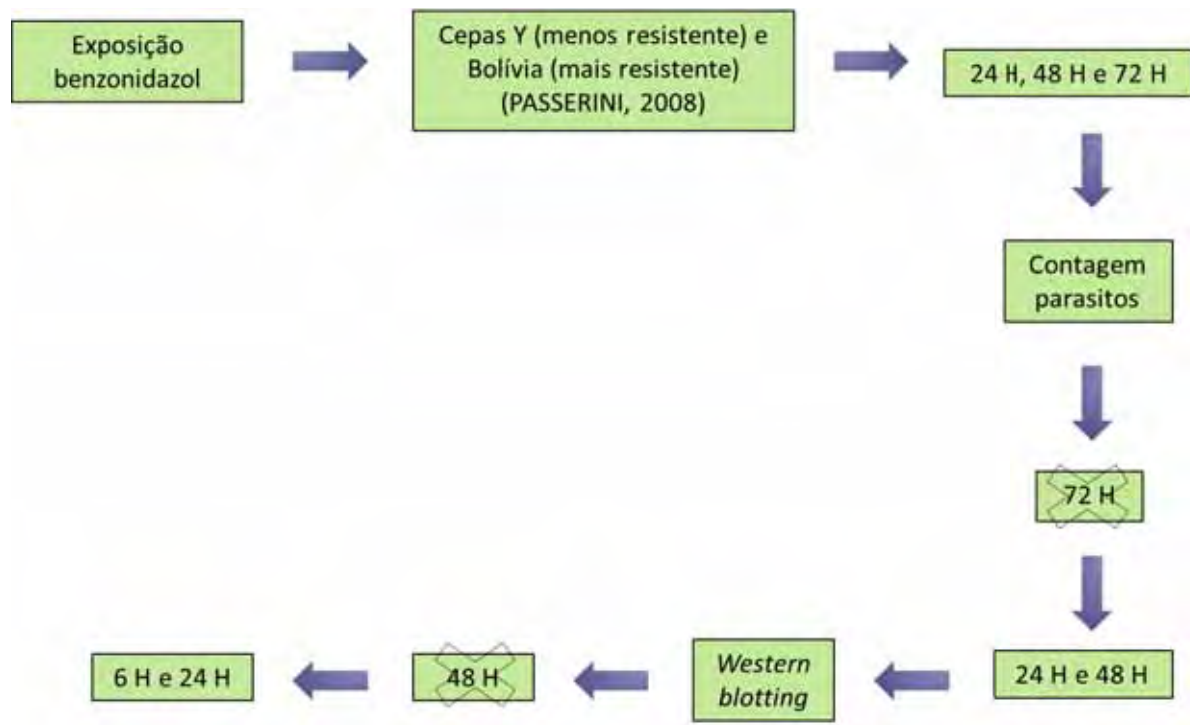
inoculação, nova dose de proteína recombinante foi injetada com adjuvante incompleto de Freund (BD Difco) pela mesma via, na mesma concentração e proporção descrita. Antes de iniciar as inoculações amostras de sangue da orelha do animal foram extraídas para obtenção do soro pré-imune. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 min, 4.000 x g a 4 °C para a obtenção dos soros. A verificação da produção de anticorpos policlonais anti mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE foi realizada por *Western blotting*, utilizando anticorpo antiproteína A conjugado a peroxidase 1:5.000 (Sigma), a revelação foi realizada com 1 mg/mL DAB (3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride; Sigma). Para tanto foram utilizadas diferentes concentrações dos anticorpos (1:20, 1:100 e 1:500) para verificar se reagem com 3 µg de proteínas recombinantes purificadas e nativas, estas provenientes de extrato total de *T. cruzi* da cepa Y.

3.7 Período de exposição às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno

Para saber qual o período em que as cepas de *T. cruzi* se encontravam na fase log de crescimento (1.10^7 parasitos/mL) estabeleceram-se curvas de crescimento. Os tempos de exposição das cepas de *T. cruzi* às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno foram de 6 e 24 h.

Nos experimentos realizados anteriormente no laboratório utilizando BZ (dados não publicados) foram construídas curvas de crescimento para verificar os tempos de exposição com BZ a serem empregados na avaliação do nível de expressão das enzimas. Para tanto foram utilizadas as culturas das cepas Y e Bolívia, consideradas, respectivamente segundo Passerini (2008), como padrão menos e mais resistente ao BZ. Para tanto, os parasitos foram tratados com BZ por 24, 48 e 72 h. No tratamento por 72 h os parasitos perdiam a viabilidade, ou seja, morriam; portanto os períodos de exposição seriam por 24 e 48 h. Inicialmente os tempos foram 24 e 48 h com base nas curvas de crescimento obtidas. Porém, ao serem realizados os testes prévios por *Western botting* com os extratos totais de *T. cruzi*, verificou-se que não era possível realizar a análise da expressão das enzimas se as cepas de *T. cruzi* fossem induzidas até o tempo de 48 h, dada a dificuldade na visualização das bandas no *blotting* (dados não mostrados). Por isso, os tratamentos com BZ e os derivados de diaminas do ferroceno foram por 6 e 24 h (Figura 13).

Figura 13: Período de tratamento dos parasitos com BZ.

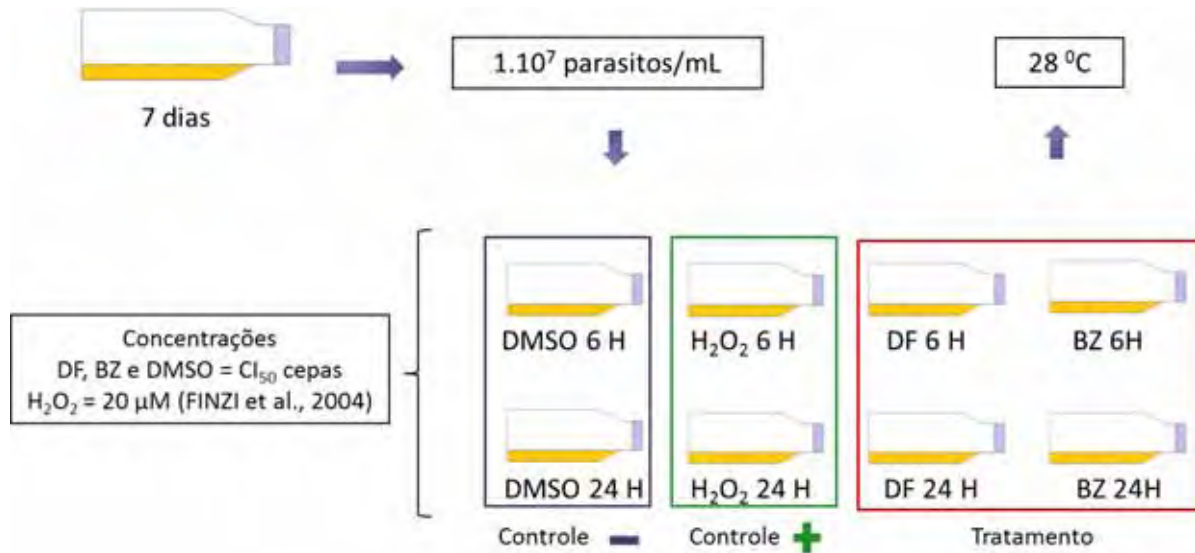


Fonte: Autor.

3.8 Indução da expressão das enzimas das cepas de *T. cruzi* tratadas com as estruturas derivadas de diaminas do ferroceno

Os testes foram iniciados com 1.10^7 células/mL, cultura em fase log de crescimento. Nos tratamentos com as estruturas derivadas de diaminas do ferroceno e BZ (*N*-benzyl-2-nitro 1*H*-imidazol-1-acetamide; Sigma), as concentrações utilizadas foram as CI_{50} das cepas. O grupo controle negativo foi exposto ao DMSO (*dimethylsulfoxide*; Sigma) na mesma concentração que o grupo tratamento recebeu das estruturas derivadas de diaminas do ferroceno. O grupo controle positivo foi exposto ao H_2O_2 (peróxido de hidrogênio 30% PA; Merck), na concentração de 20 μ M segundo Finzi et al. (2004). BZ foi empregado como controle para verificar se havia diferença de expressão entre os tratamentos com BZ e os derivados de diaminas do ferroceno. As culturas, volume final de 25 mL, foram mantidas sob tratamento por 6 e 24 h a 28 °C (Figura 14).

Figura 14: Tratamentos de *T. cruzi* para expressarem as proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE. As concentrações utilizadas dos derivados de diaminas do ferroceno (DF), benzonidazol (BZ) e *dimethylsulfoxide* (DMSO) foram as referentes aos CI_{50} de cada cepa, para H_2O_2 foi de 20 μ M. 6 H e 24 H = 6 e 24 horas de tratamento.

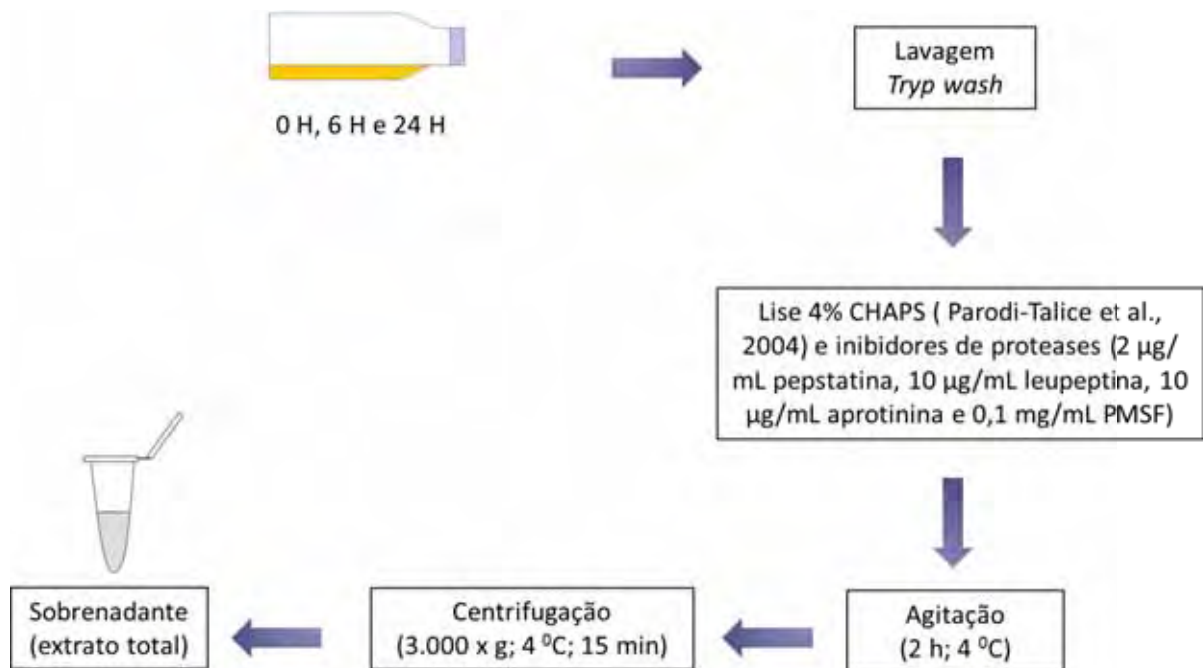


Fonte: Autor.

3.9 Obtenção dos extratos totais de proteínas das cepas de *T. cruzi*

As culturas provenientes dos tratamentos por 6 e 24 h a 28 °C foram centrifugadas à temperatura ambiente, por 15 min a 3.000 x g. O precipitado obtido foi ressuspensão com o tampão *tris wash* e centrifugado, nas mesmas condições descritas e repetido por duas vezes. Para a lise foi utilizado tampão segundo Parodi-Talice et al. (2004), acrescido de inibidores de proteases: 2 μ g/ mL pepstatina, 10 μ g/mL leupeptina e 10 μ g/mL aprotinina. Os parasitos foram deixados sob leve agitação constante (260 H; Adamo) por 2 h a 4 °C para a lise celular. A seguir, as amostras foram centrifugadas, à temperatura ambiente por 15 min a 3.000 x g, para a obtenção dos extratos totais, sobrenadante (Figura 15).

Figura 15: Obtenção dos extratos totais de *T. cruzi* tratados para expressarem as proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE. 0 H = tempo inicial, 6 H e 24 H = 6 e 24 horas de tratamento.



Fonte: Autor.

3.10 Quantificação de proteínas

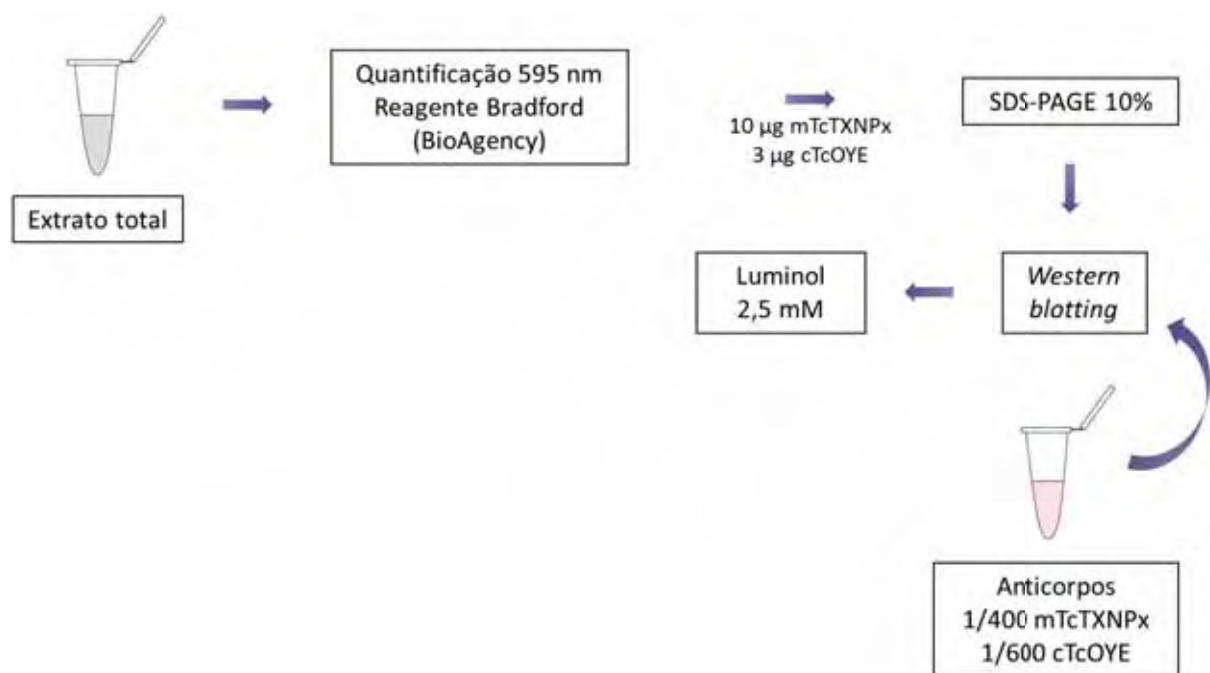
A concentração das proteínas presentes nos extratos totais foi avaliada com reagente de Bradford (BioAgency), leitura realizada a 595 nm (DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer; Beckman), segundo orientações do fabricante. Para a obtenção da curva padrão foi utilizado SAB (soro albumina bovina) nas seguintes concentrações: 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, diluídas em água deionizada (Milli-Q; Merck Millipore).

3.11 Western blotting

Nas amostras dos extratos totais foi adicionado tampão de amostra contendo 250 mM DTT (*dithiothreitol*), aquecendo-se a 96 °C por 10 min. A seguir, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), com 150 V a 4 °C. Para a eletroforese foi utilizado o tampão Tris-glicina. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*; GE Healthcare), com 50 V e 0,8 mA/cm², por 1 h a 4 °C. Para esse procedimento foi utilizado o tampão de transferência. Para a transferência realizou-se o

seguinte: uma camada de papel filtro, gel, membrana e uma camada de papel filtro, todos umedecidos em tampão de transferência. Antes de realizar a transferência a membrana foi ativada primeiro com metanol (PA; Synth) e depois com o tampão de transferência por 5 min cada, à temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução 5% de leite desnatado dissolvido em tampão TBS por 1 h a 25 °C, sob leve agitação. A seguir, incubada com anticorpo policlonal diluído em solução 2% de leite desnatado, a 4 °C por 18 h, sob leve agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada com tampão PBS contendo 0,1 % Tween-20, por três vezes e 5 min cada, sob leve agitação. Incubou-se a membrana com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase 1:5.000 (Sigma), por 1 h à temperatura ambiente, sob leve agitação. Novamente, a membrana foi lavada como descrito. A seguir, foi realizada a revelação com 2,5 mM luminol (Sigma) numa sala escura (Figura 16). Para identificação do tamanho das proteínas foi utilizado marcador molecular (ColorPlus Prestained Protein Ladder; New England).

Figura 16: Quantificação das proteínas presentes nos extratos totais e avaliação de expressão das proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE.



Fonte: Autor.

RESULTADOS

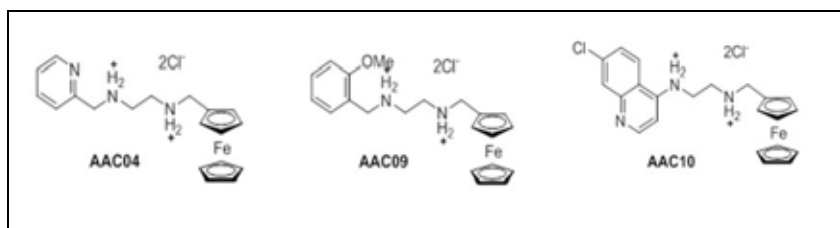
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de suscetibilidade das cepas de *T. cruzi* às estruturas derivadas de diaminas do ferroceno e toxicidade em HepG2

A citotoxicidade *in vitro* aos derivados de diamina do ferroceno (Figura 17) apresentou maior atividade em relação ao BZ. A partir dos valores das absorbâncias, foram calculadas as porcentagens de parasitos mortos. Por meio do programa Origin V.7.0 obteve-se a concentração das substâncias referente à CI_{50} . Os valores de CI_{50} (Tabela 2) representam as médias de triplicatas.

A substância AAC09 foi a mais citotóxica para os parasitos. Os resultados obtidos demonstram que cada cepa apresenta um valor de CI_{50} diferente para cada substância. Os valores variaram (μM) de 2,21 a 15,20 para a substância AAC09, de 2,74 a 35,90 para a substância AAC04 e de 9,20 a 20,20 para a substância AAC10, enquanto que para BZ foram de 27,28 a 105,28.

Figura 17: Estruturas dos derivados de diaminas do ferroceno.



Fonte: Modificado de Francisco, A. I. et al. (dados não publicados).

Os valores de Índice de Segurança (IS) dos testes com HepG2 (Tabela 3), obtidos a partir da relação entre CI_{50} de HepG2 e CI_{50} de *T. cruzi* (cepa Y), indicaram que os dois derivados de diaminas do ferroceno (substâncias AAC09 e AAC04) apresentam nível de segurança aceitável, pois estão acima de 10. Entretanto, o valor de IS para a substância AAC10 apresentou valor menor que 10.

Tabela 2: Avaliação da suscetibilidade das cepas de *T. cruzi*, formas epimastigotas, a diaminas do ferroceno e benzonidazol

Cepas	CI ₅₀ µM			
	AAC09	AAC04	AAC10	BZ
Y	2,21	2,74	12,10	34,62
SI1	10,80	14,30	9,20	27,28
SI8	10,80	35,90	20,20	58,40
QMII	15,20	33,97	15,60	63,78
Bolívia	13,40	33,97	12,10	96,06
SIGR3	13,40	33,97	20,20	105,28

Fonte: Autor.

Tabela 3: Concentração inibitória (CI₅₀) de HepG2 e índice de segurança (IS)

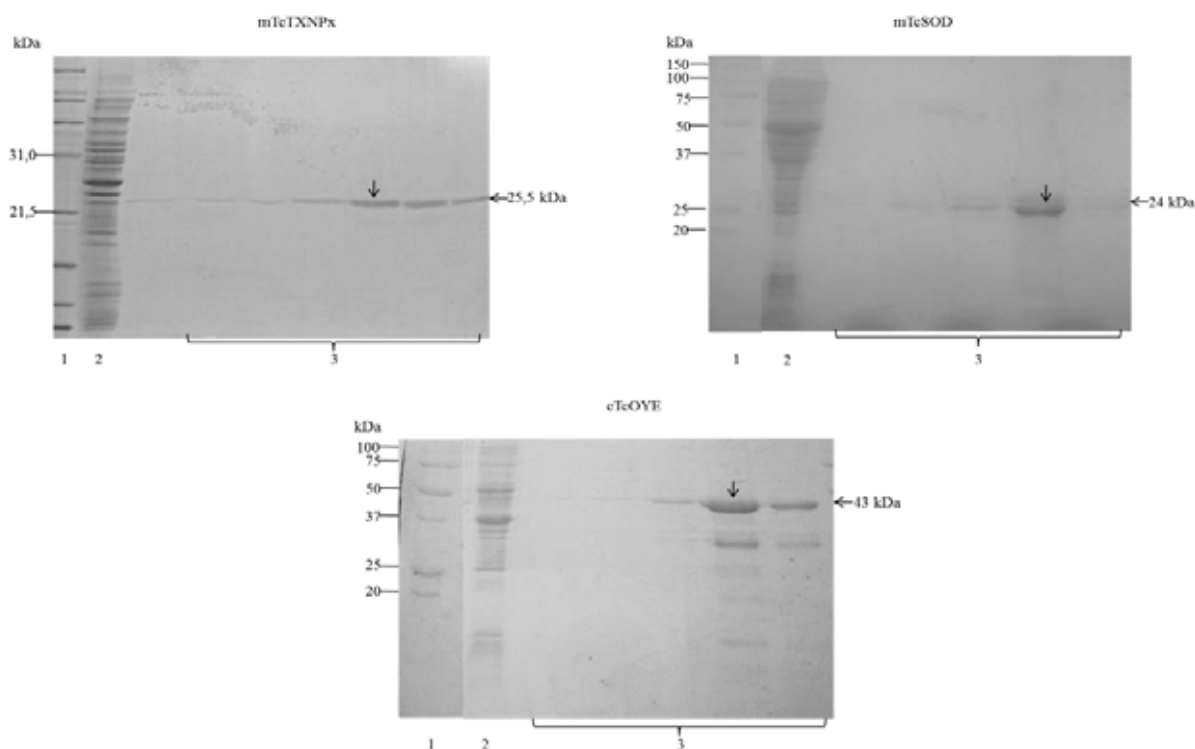
Compostos	CI ₅₀	IS
AAC09	32,26	14,60
AAC04	85,45	22,85
AAC10	20,31	1,58
BZ	2126,16	62,53

Fonte: Autor.

4.2 Purificação de proteínas recombinantes

A confirmação da purificação da proteína recombinante rmTcTXNPx (25,5 kDa) demonstrou excelente grau de pureza, pois não foram observadas bandas contaminantes. A proteína purificada foi usada para a produção de anticorpos policlonais em coelhos. No caso das amostras de rmTcSOD e rcTcOYE foram recortadas as bandas de aproximadamente 24 kDa e 43 kDa, respectivamente e, posteriormente inoculadas em coelhos para a produção de anticorpos policlonais (Figura 18).

Figura 18: Expressão e purificação das proteínas recombinantes. SDS-PAGE 15% corado pelo *Coomassie brilliant blue* R-250. (1) Marcador molecular; (2) fração de proteína não purificada; (3) frações contendo as proteínas recombinantes purificadas, mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE. As setas verticais indicam as amostras usadas na produção de anticorpos e as horizontais os valores dos pesos moleculares das respectivas proteínas recombinantes.

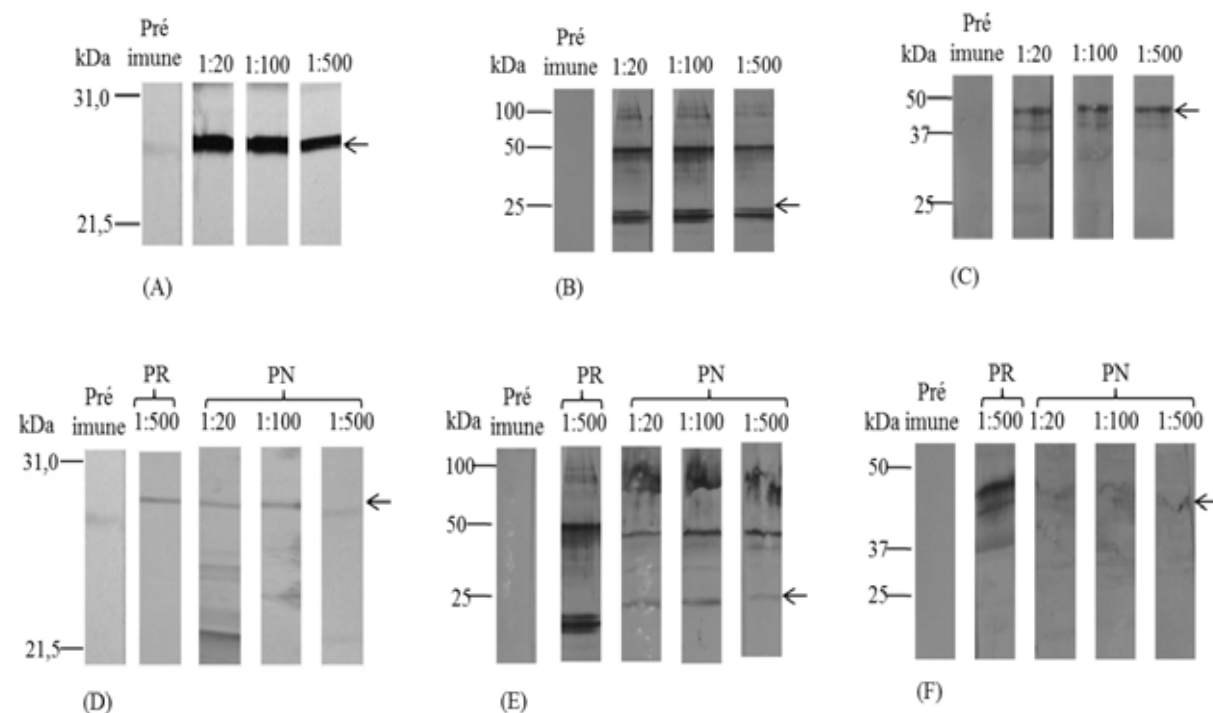


Fonte: Autor.

4.3 Obtenção de anticorpos policlonais

Através de análises por *Western blotting* foi possível confirmar a produção dos anticorpos policlonais das proteínas recombinantes mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE (Figura 19). Para tanto, os anticorpos obtidos, diluídos em diferentes concentrações, foram incubados com amostras de proteínas recombinantes e também com as provenientes de extrato total da cepa Y (cepa modelo) de *T. cruzi*.

Figura 19: Reação de *Western blotting* dos anticorpos policlonais com as proteínas recombinantes (A-C) e extratos totais da cepa Y de *T. cruzi* (D-F). (A) Anti mTcTXNPx e rmTcTXNPx (25,5 kDa). (B) Anti mTcSOD e rmTcSOD (24 kDa). (C) Anti cTcOYE e rcTcOYE (43 kDa). (D) Anti mTcTXNPx e extrato total. (E) Anti mTcSOD e extrato total. (F) Anti cTcOYE e extrato total. As setas indicam as proteínas. PR: proteína recombinante; PN: proteína nativa.



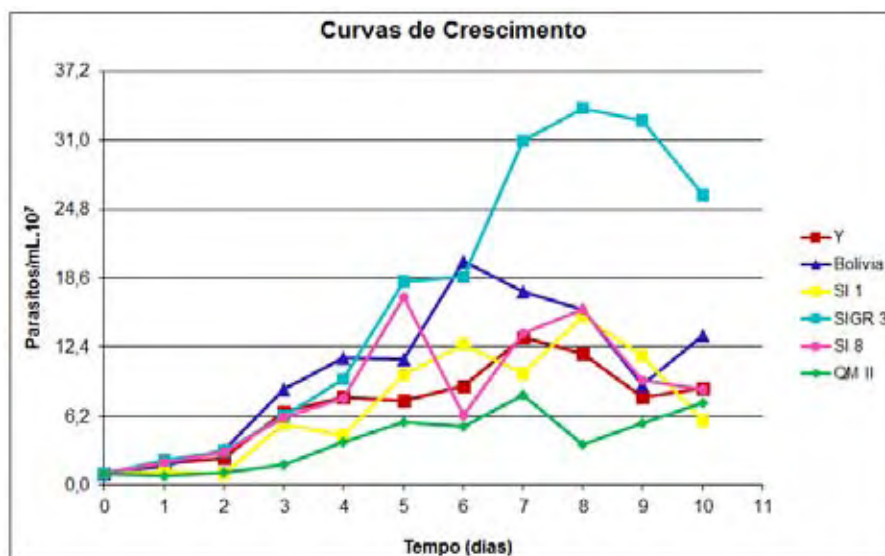
Fonte: Autor.

Uma vez observada a produção dos anticorpos de interesse, amostras de sangue foram coletadas após 15 dias da segunda inoculação para uso posterior e os soros mantidos a -80°C até o momento de uso.

Os anticorpos policlonais assim obtidos foram utilizados para avaliar as possíveis diferenças no nível de expressão das proteínas - mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE - envolvidas na resistência do parasito ao estresse oxidativo produzido com os derivados de diamina do ferroceno.

4.4 Curvas de crescimento e tratamentos das cepas de *T. cruzi*

As cepas de *T. cruzi* levaram sete a oito dias para entrar em fase log de crescimento (Figura 20). A partir das culturas de sete dias foram estabelecidas as culturas para os tratamentos com os derivados de diaminas do ferroceno.

Figura 20: Curvas de crescimento das cepas epimastigotas de *T.cruzi* em meio LIT.

Fonte: Autor.

4.5 Expressão das enzimas após exposição aos derivados de diaminas do ferroceno e benzonidazol

Pode-se observar nitidamente que houve diferenças no comportamento de cada cepa estudada relativamente à expressão de mTcTXNPx (Figura 21, Tabela 4) após tratamento com a substância AAC10 e BZ por 6 e 24 horas.

A proteína recombinante rmTcTXNPx de 25,5 kDa foi usada nos experimentos para indicar o tamanho esperado no extrato total. A ausência de bandas de 25,5 kDa nos extratos, pode ser devido à baixa expressão da proteína nos parasitos. Como controle positivo da expressão, utilizou-se H_2O_2 , sendo esperado o aumento na produção de mTcTXNPx. A concentração de H_2O_2 de 20 μM , descrita como não letal para as cepas utilizadas por Finzi et al. (2004), demonstrou-se tóxica para as cepas usadas no presente estudo.

Todas as cepas mostraram banda de polipeptídeo em torno de 58 kDa em amostras não tratadas que receberam apenas DMSO (controle negativo). Apenas a cepa SI8 mostrou aumento da expressão desse polipeptídeo relativamente às outras cepas em amostras não tratadas. As cepas Y e QMII expressaram esse polipeptídeo nos tratamentos com H_2O_2 . Na cepa SI8 esse polipeptídeo foi mais expresso em amostras tratadas com BZ do que com a substância AAC10. As cepas Bolívia e QMII praticamente apresentaram a mesma expressão desse polipeptídeo quando tratadas com substância AAC10 e BZ. A cepa Y mostrou maior expressão desse polipeptídeo no tratamento com a substância AAC10 em comparação com

outras cepas. Além disso, chama a atenção que, apenas nas amostras da cepa Y tratadas com BZ, houve expressão visivelmente maior do polipeptídio do que quando tratada com substância AAC10 e mesmo não tratada.

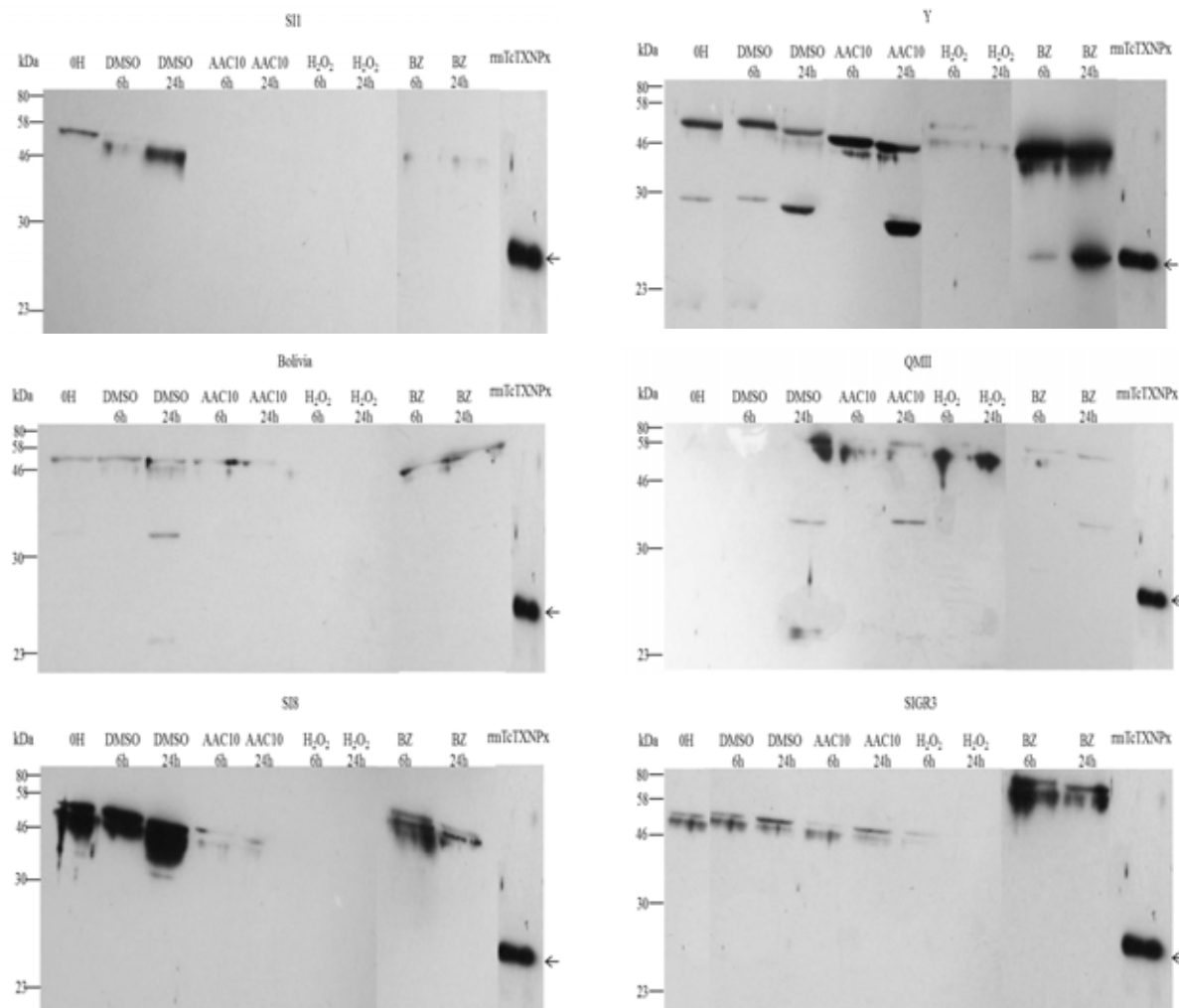
Foram encontradas bandas próximas de 58 kDa para todas as cepas tratadas com benzonidazol, enquanto que entre 58 e 80 kDa apenas para SIGR3. Apenas em QMII foi expressa uma banda de polipeptídio de aproximadamente 23 kDa na amostra não tratada em 24 horas. Um polipeptídio de 30 kDa foi também reconhecido pelo anticorpo somente na cepa Y tratada com substância AAC10 em 24 horas, assim como nas amostras sem tratamento. Enquanto que as cepas Bolívia e QMII mostraram polipeptídio que varia de 30 e 46 kDa nas amostras sem tratamento, mas somente a cepa QMII mostrou esse polipeptídio em 24 horas de tratamento com a substância AAC10.

No tratamento com benzonidazol verificou-se que apenas na cepa Y, nitidamente, houve aumento da produção da enzima em 24 horas de tratamento. No tratamento com benzonidazol não foi observada a banda de 25,5 kDa para as outras cepas.

Nos tratamentos com as substâncias AAC04 e AAC09 não foram observadas bandas referentes aos polipeptídios de 30 e 58 kDa para a cepa Y como ocorreu com a substância AAC10. Também não foi observada a banda de 25,5 kDa (Figura 22).

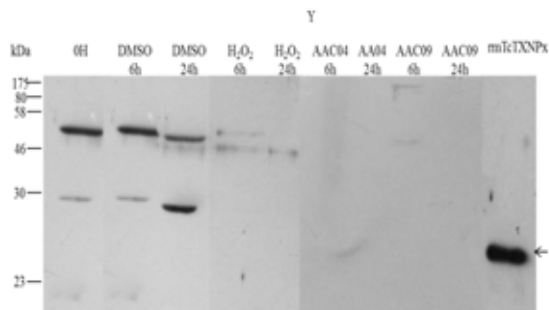
Nos tratamentos com as substâncias AAC04 e AAC09 somente foi possível a aplicação de amostras de extratos totais da cepa Y, pois, para as outras cepas a concentração de 10 µg para mTcTXNPx e 3µg para cTcOYE não permitiu qualquer avaliação. Dado a dificuldade na obtenção dessas enzimas, visto que foram expressas em menor quantidade, não foi possível sua revelação nos blots.

Figura 21: *Western blotting* dos extratos totais (10 µg/poço) das cepas de *T. cruzi* tratadas com as substância AAC10 e BZ e revelado com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400). OH = tempo inicial, BZ = benzonidazol e rmTcTXNPx= mTcTXNPx recombinante. A seta horizontal indica rmTcTXNPx de 25,5 kDa.



Fonte: Autor.

Figura 22: *Western blotting* dos extratos totais (10 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com as substâncias AAC04 e AAC09 e revelado com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400). OH = tempo inicial e rmTcTXNPx= mTcTXNPx recombinante. A seta horizontal indica rmTcTXNPx de 25,5 kDa.



Fonte: Autor.

Na avaliação da produção da enzima cTcOYE, observou-se que foi mais expressa do que mTcTXNPx. Por isso, foram necessários testes com diferentes concentrações para que fosse possível a visualização de bandas por *Western blotting*. Em vista disso, foram utilizados 3µg/poço ao invés de 10 µg/poço, bem como a diluição do anticorpo de 1/600 ao invés de 1/400.

Não foram observadas bandas de 43 kDa, tamanho esperado de cTcOYE, nos extratos totais (Figura 23; Tabela 5). Essa ausência de bandas pode também ser devido a baixa expressão, como ocorreu com mTcTXNPx.

Em todas as cepas, exceto QMII, o anticorpo reconheceu polipeptídios de aproximadamente 46 kDa e 58 kDa. No entanto, para as cepas SI1 e SI8, não foram observadas essas bandas nas amostras tratadas com H₂O₂. Ao passo que para SIGR3, essas bandas não foram visualizadas apenas no tratamento com H₂O₂ com 24 horas de exposição. Também foi identificada, apenas para a cepa SIGR3, polipeptídio de aproximadamente 175 kDa, exceto nas amostras provenientes de tratamento com H₂O₂.

Observou-se diferenças na expressão de cTcOYE após tratamento com a substância AAC10 e benzonidazol. O benzonidazol produziu na cepa SIGR3 maior expressão dos polipeptídios de 46 kDa e 58 kDa, respectivamente. Enquanto que esses polipeptídios não foram visualizados nas cepas SI1, SI8 e QMII. No caso de QMII notou-se, praticamente, que não ocorre diferença na expressão após tratamento com as substâncias AAC10 e benzonidazol.

Tabela 4: Polipeptídios reconhecidos pelo anticorpo anti mTcTXNPx

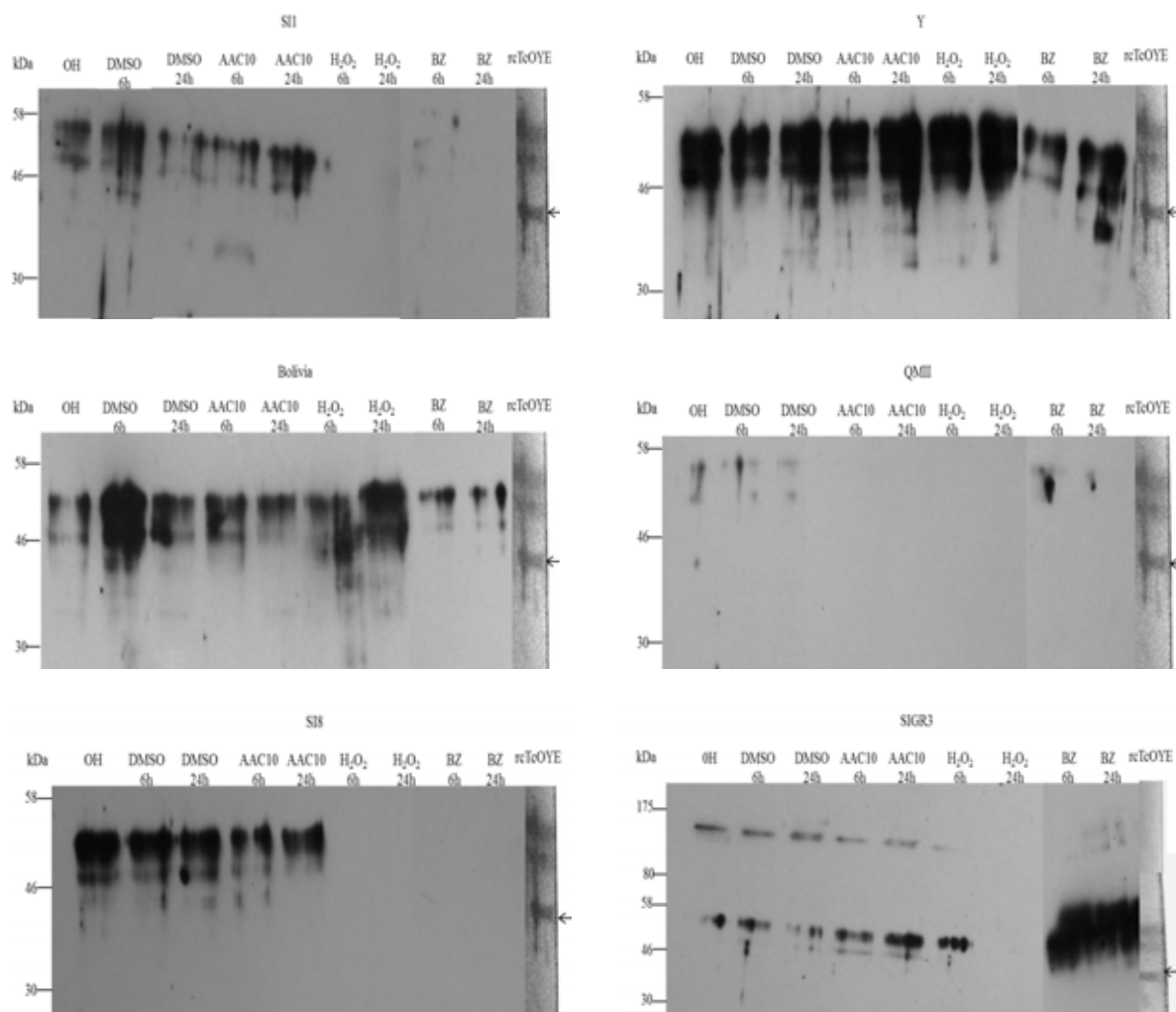
mTcTXNPx																		
	Y			Bolívia			SI1			SIGR3			SI8			QMII		
	0h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	0h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24h
DMSO	Próximo 58 kDa Entre 30 e 46 kDa	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	30 kDa	x	x	x	x	x												x
	Próximo 23 kDa																	x
H ₂ O ₂	Próximo 58 kDa		x	x	x	x											x	x
	Entre 56 e 80 kDa											x	x					
	Próximo 58 kDa		x	x	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x
	25,5 kDa		x	x														
AAC10	Próximo 58 kDa Entre 30 e 46 kDa		x	x	x	x					x	x		x	x		x	x
	30 kDa			x														x
AAC04*																		—
AAC09*																		—

*Os extratos das cepas de *T. cruzi* tratados com as substâncias AAC04 e AAC09 foram avaliados somente frente à cepa Y, que não demonstrou expressão dos polipeptídios encontrados em outras cepas.

Fonte: Autor.

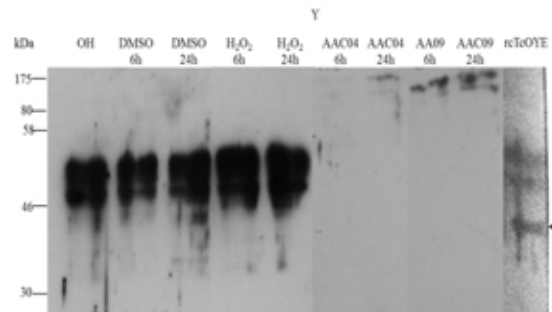
No tratamento com a substância AAC09, a cepa Y apresentou polipeptídio de 175 kDa (Figura 24). Esse polipeptídio não foi visualizado nos tratamentos com as substâncias AAC10 e AAC04 e benzonidazol para a mesma cepa.

Figura 23: *Western blotting* dos extratos totais (3 µg/poço) das cepas de *T. cruzi* tratadas com as substância AAC10 e BZ e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:600). OH = tempo inicial, BZ = benzonidazol e rcTcOYE = cTcOYE recombinante. A seta horizontal indica rcTcOYE de 43 kDa.



Fonte: Autor.

Figura 24: *Western blotting* dos extratos totais (3 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com as substâncias AAC04 e AAC09 e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:600). OH = tempo inicial e rcTcOYE = cTcOYE recombinante. A seta horizontal indica rcTcOYE de 43 kDa.



Fonte: Autor.

Tabela 5: Polipeptídios reconhecidos pelo anticorpo anti cTcOYE

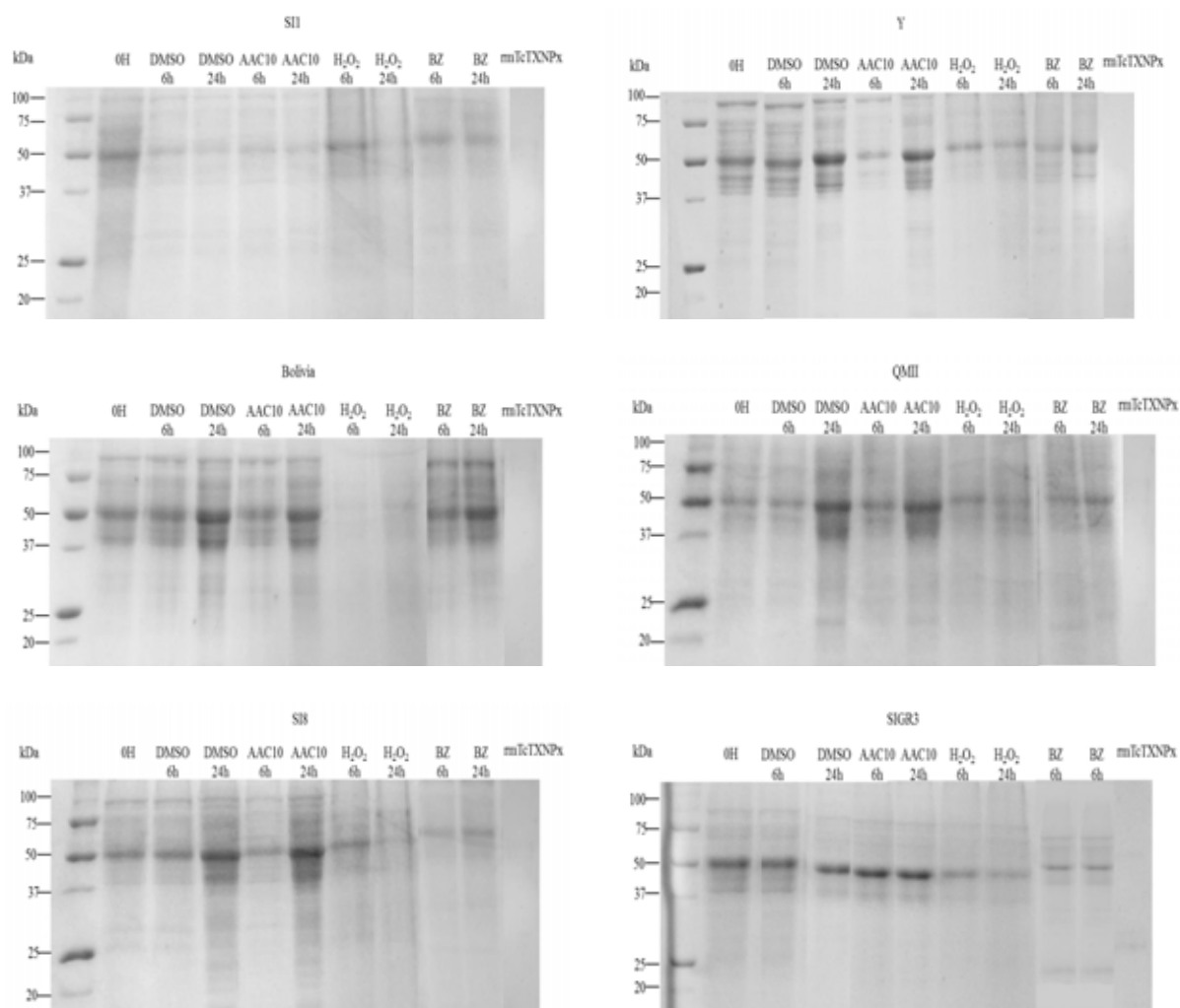
cTcOYE																		
	Y			Bolivia			SI1			SIGR3			SI8			QMII		
	0h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	0h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24h
DMSO	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Próximo 46 kDa																	
	Próximo 58 kDa	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Próximo 175 kDa									x	x	x						
H ₂ O ₂																		
	Próximo 46 kDa	x	x		x	x				x								
	Próximo 58 kDa	x	x		x	x				x								
BZ																		
	Próximo 46 kDa	x	x		x	x										x	x	x
	Próximo 58 kDa	x	x		x	x												
AAC10																		
	Próximo 175 kDa									x	x	x						
	Próximo 46 kDa	x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			
	Próximo 58 kDa	x	x		x	x		x	x	x	x	x						
AAC04*																		
AAC09*																		
	Próximo 175 kDa																	

*Os extratos das cepas de *T. cruzi* tratados com as substâncias AAC04 e AAC09 foram avaliados somente frente à cepa Y, que não demonstrou expressão dos polipeptídios encontrados em outras cepas. A única exceção foi o tratamento com a substância AAC09, no qual foi identificado polipeptídio próximo de 175 kDa na cepa Y.

Fonte: Autor.

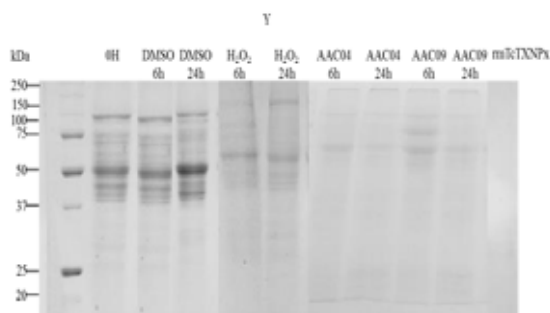
As figuras 25 a 28 apresentam os géis de poliacrilamida, SDS-PAGE 10%, demonstrando as respectivas concentrações aplicadas de extratos em cada poço, 10 µg/poço (Figuras 25 e 26) e 3 µg/poço (Figuras 27 e 28), respectivamente, para garantir que as diferenças nas expressões das proteínas não fossem devido a problemas na quantidade de amostra aplicada no gel.

Figura 25: SDS-PAGE 10 % corado por *Coomassie Blue* dos extratos totais (10 µg/poço) das cepas de *T. cruzi* tratadas com as substância AAC10 e BZ. OH = tempo inicial, rmTcTXNPx = mTcTXNPx recombinante e BZ = benzonidazol.



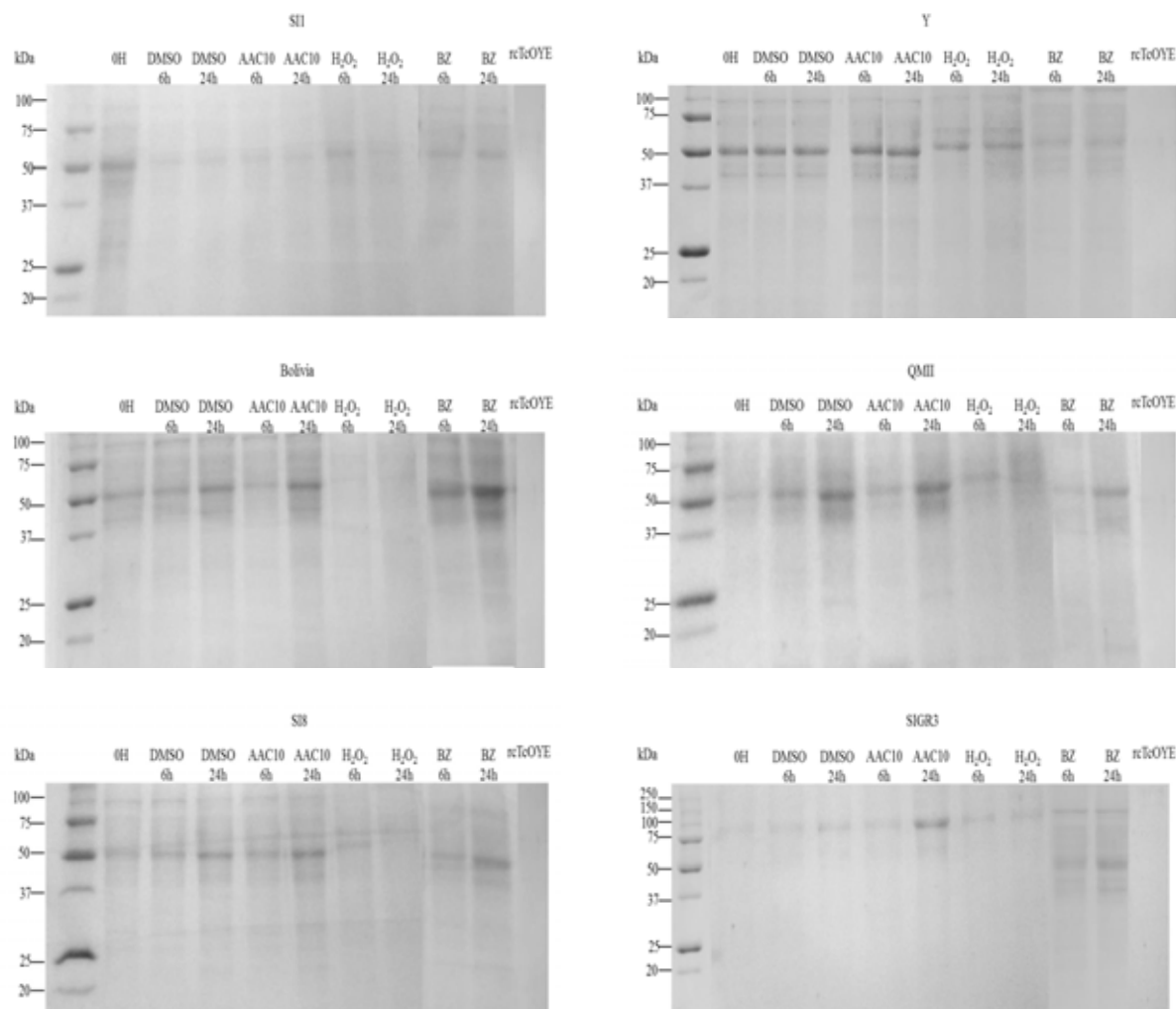
Fonte: Autor.

Figura 26: SDS-PAGE 10 % corado por *Coomassie Blue* dos extratos totais (10 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com as substâncias AAC04 e AAC09. OH = tempo inicial e rmTcTXNPx = mTcTXNPx recombinante.



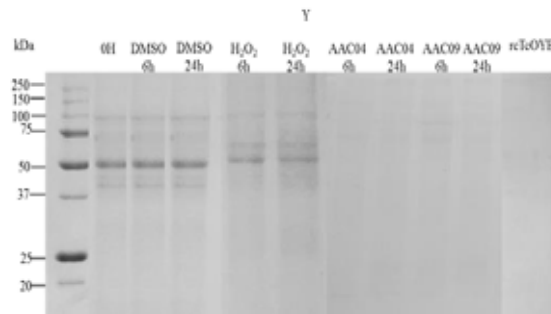
Fonte: Autor.

Figura 27: SDS-PAGE 10 % corado por *Coomassie Blue* dos extratos totais (3 µg/poço) das cepas de *T. cruzi* tratadas com a substância AAC10 e BZ. OH = tempo inicial, rcTcOYE = cTcOYE recombinante e BZ = benzonidazol.



Fonte: Autor.

Figura 28: SDS-PAGE 10 % corado por *Coomassie Blue* dos extratos totais (3 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com as substâncias AAC04 e AAC09. OH = tempo inicial e rcTcOYE = cTcOYE recombinante.



Fonte: Autor.

Em relação aos testes para avaliação do nível de expressão de mTcSOD, houve dificuldade na visualização de bandas individualizadas no *Western blotting*, pois o filme tornava-se totalmente negro após a revelação, devido à grande quantidade de proteína produzida, mesmo com 3µg de extrato total por poço no gel. Diante disso, optou-se por realizar os testes oportunamente, diluindo previamente as amostras dos extratos totais.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A adição de ferroceno em fármacos aumenta a citotoxicidade em células do câncer de mama (NEUSE, 2005; HILLARD et al, 2006; HEILMANN et al., 2008), antimicobactéria - *Mycobacterium tuberculosis* (RALAMBOMANANA et al., 2008) e antimalárica - *Plasmodium spp.* Ferroquina, proveniente da adição de ferroceno em cloroquina, apresenta melhor citotoxicidade contra cepas de *Plasmodium spp.* resistentes a cloroquina. Segundo os autores, isso é devido a adição do ferroceno na estrutura da cloroquina (BIOT et al., 1997; DOMARLE et al., 1998; DELHAES et al., 2001).

Tendo em vista que ferroquina apresentou atividade antimalárica em cepas resistentes a cloroquina, decidiu-se investigar neste trabalho, se derivados de diaminas do ferroceno também apresentavam atividade anti *T. cruzi*.

Ferroceno ao ser oxidado forma o cátion ferrocênio que apresenta um elétron desapareado. Ao apresentar um elétron desapareado, o cátion formado é considerado um típico radical livre (NEUSE, 2005). Um grupo desativador num anel benzênico faz com que o anel reaja menos rapidamente, porque retira elétrons ao invés de doar ao anel. Assim, a energia de ativação aumenta e a reação fica mais lenta. Halogênios, como flúor, cloro e bromo, por serem mais eletronegativos que o carbono, exercem efeito indutivo retirador de elétrons (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

Acredita-se que a polaridade e lipofilicidade de uma molécula interfiram na citotoxicidade. Em derivados de diaminas, testados em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. donovani*, os que se apresentavam mais polares melhoraram a habilidade dos compostos de atravessar a membrana celular dos parasitos, com isso houve aumento na atividade inibitória de crescimento. Outro fator importante é o tamanho da cadeia carbônica nos compostos, quanto maior, menor a atividade tripanossomicida (CAMINOS et al., 2012). Em derivados de ferrocenil chalcona, testados em *P. falciparum*, o tamanho da cadeia carbônica e a polaridade interferem na atividade antiplasmodial. Acredita-se que tais propriedades aumentaram a geração de radicais livres do ferroceno, assim foram melhoradas as características óxido redutoras desse metaloceno (WU et al., 2006).

De acordo com estudo realizado com derivados de ferroceno em células tumorais, a citotoxicidade poderia ser ocasionada pelo ataque à membrana celular provocada pelo radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$). O dano ao DNA não é devido à intercalação do ferroceno, mas ocorreria uma interação eletrostática entre o ferroceno e o esqueleto de fosfatos do DNA. Desse modo, o dano ao DNA pode estar relacionado com a ação dos radicais livres produzidos pelas

reações de redução do ferroceno. Devido ao dano oxidativo ao DNA, somente compostos com ferroceno foram capazes de inibir o crescimento celular das células cancerígenas (OSELLA et al., 2000). Ferroquina (antimalárico ferroceno) apresenta atividade em cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, agindo não somente na inibição da formação de hemozoína; os radicais de hidroxila produzidos são muito agressivos aos ácidos graxos insaturados (fosfolipídios) das membranas e promovem uma reação em cadeia óxido redutora (CHAVAIN et al., 2008).

Das três substâncias testadas neste trabalho, a que apresentou maior citotoxicidade foi AAC09. Provavelmente a maior atividade deve-se ao grupo metóxi, pois apresenta oxigênio que contém par de elétrons que pode reagir e contribuir para a formação de ERO, tóxicas para o parasito. Além do mais, AAC09 não apresenta o grupo desativador, não ocasionando diminuição na reatividade da molécula. Quanto às substâncias AAC04 e AAC10, ambas apresentam piridina, porém AAC10 contém piridina ligada a anel aromático com halogênio, o que forma o grupo cloroquinolina. A presença de cloro poderia interferir nas propriedades óxido redutoras do ferroceno, visto que atuaria como um grupo desativador do anel, com isso interfere na reatividade da molécula; por isso AAC10 apresentou-se menos tóxica que AAC09. Porém AAC10 foi mais tóxica que AAC04 que não apresenta o grupo desativador. Provavelmente apesar de AAC10 conter o grupo desativador, este poderia ter aumentado a lipofilicidade dessa substância. Assim, por AAC10 apresentar-se mais lipofílica que AAC04, uma maior quantidade de AAC10 atravessou a membrana de *T. cruzi*, consequentemente tornando-se tóxica.

Estudos com as diaminas do ferroceno a respeito de suas polaridades e lipofilicidade permitirão avaliar se nesses compostos também ocorre o mesmo. Em princípio o tamanho da cadeia carbônica que separa os grupos substituintes do ferroceno é o mesmo. Assim, avaliar se ocorre uma relação entre a citotoxicidade de AAC09, AAC04 e AAC10 com polaridade, lipofilicidade e o tamanho da cadeia carbônica.

Diaminas podem ligar-se a regiões do DNA ricas em sequências AT que apresentem no mínimo quatro pares de AT consecutivos. As amins fazem ligação de hidrogênio, o grupo –NH interage com o H aceptor, N3 de A e O2 de T na região do sulco menor do DNA. Além do DNA nuclear, tripanosomas apresentam o cinetoplasto que contém DNA mitocondrial que consiste em DNA circular (WILSON et al., 2008). No DNA mitocondrial existem sequências muito ricas em AT, desse modo compostos que apresentam o cinetoplasto como alvo permitiria maior especificidade de agentes antiparasitários. Interferência na transcrição e replicação do DNA mitocondrial pode conduzir à morte do tripanosoma (LIU et al., 2007).

A destruição do cinetoplasto poderia ser ocasionada pela interferência na atividade normal de topoisomerase II (WILSON et al., 2008), enzima importante que atua nos processos de replicação e transcrição, catalisa mudanças topológicas na molécula de DNA e permite o rompimento da dupla fita de DNA (DETERDING et al., 2005; ZUMA et al., 2011). Desse modo, compostos que se ligam a AT poderiam induzir mudanças topológicas ou inibir proteínas do processo de replicação, provocando erros na replicação e degradação do DNA (WILSON et al., 2008) porque poderiam impedir a ligação da topoisomerase II ao DNA.

Parece existir tendência do composto com diamina a se concentrar no cinetoplasto ao invés do núcleo (MATHIS et al., 2006; BATISTA et al., 2010). Compostos de diaminas aromáticas ocasionaram alterações morfológicas na mitocôndria e núcleo em *T. cruzi*, perda do potencial de membrana, exposição de resíduos de fosfatidilserina (PS) e fragmentação do DNA, características que indicam apoptose (DE SOUZA et al., 2006).

Mais estudos são necessários para melhorar o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos compostos de diaminas do ferroceno. Investigações sobre a tendência em interagir com DNA, e por isso, compostos com diaminas se concentrarem no cinetoplasto. Se a interferência na atividade da topoisomerase II pode conduzir ao processo de apoptose que poderia ser aumentada devido aos processos oxidativos ocasionados pelo ferroceno.

Os efeitos colaterais do BZ são muito tóxicos, como dermatite com erupção cutânea, edema generalizado, dor articular e muscular, depressão da medula óssea, agranulocitose, polineuropatia e trombocitopenia, caracterizada por redução de plaquetas, hemorragia e sangramento das mucosas, que conduz à descontinuidade no uso do medicamento (COURA; CASTRO, 2002). Além dos graves efeitos colaterais, a atividade do BZ varia para as distintas cepas, assim como a baixa atividade antiparasitária na fase crônica (URBINA; DOCAMPO, 2003). Os valores de IS obtidos indicam que AAC09 e AAC04 por apresentarem valores acima de 10, podem ser considerados como seguros, ou seja, não tóxicos para as células de mamíferos, pelo menos neste modelo *in vitro* utilizado. Apesar dos valores dessas duas substâncias estarem abaixo do BZ, seria interessante dar continuidade aos estudos *in vivo* para avaliar os efeitos num modelo de mamífero, justamente porque apesar do IS de BZ indicar que é seguro, na prática, é muito tóxico quando administrado aos pacientes. Além de que uma molécula mais lipofílica permitiria atingir as formas intracelulares do parasito, pois um dos problemas no uso de BZ é a limitada penetração nos tecidos dos hospedeiros para atingir os amastigotas.

Um fato que chamou a atenção foi que AAC10 em *T. cruzi* foi menos tóxico, porém o IS indicou alta toxicidade para HepG2. Dado que a lipofilicidade interfere na citotoxicidade,

pois quanto mais lipofílica, maior a atividade tóxica (CAMINOS et al., 2012), talvez essa molécula seja menos lipofílica para *T. cruzi* do que para HepG2. Outras possibilidades seriam algum mecanismo que auxilia *T. cruzi* a armazenar as diaminas do ferroceno como um mecanismo de escape, ou que existam transportadores de membranas envolvidos na captação desses compostos.

Acidocalcisomes são organelas ácidas que armazenam cálcio e alta concentração de fósforo (Pi, PPi e poli P) e podem ser encontradas desde bactérias a células humanas. Em tripanosomatídeos esses fósforos poderiam ser utilizados como doadores de energia em algumas de suas reações metabólicas. Outra função estaria relacionada à adaptação do parasito aos estresses ambientais (vetor, sangue e citosol do hospedeiro), dado que permitiria ao tripanosomatídeo adequar-se às variações osmóticas encontradas (DOCAMPO; MORENO, 2001). Em tripanosomas africanos, embora ainda não saiba se está relacionada com proteção da célula (MATHIS et al., 2006), acredita-se que essa organela poderia apresentar papel de armazenar compostos derivados de diaminas (BATISTA et al., 2010).

Existem transportadores que podem estar relacionados com o transporte de diaminas nos parasitos (WILSON et al., 2008). Apesar de não estar bem esclarecido, em *T. brucei* acredita-se que os transportadores em questão seriam P2, HAPT1 e LAPT1; pode ser que a resistência a diaminas, como pentamidina, deva-se a perda de tais transportadores (DE KONING, 2001; BRAY et al., 2003).

A alta variabilidade genética de *T. cruzi* (LEWIS et al., 2009; ZINGALES et al., 2009; MACEDO; SEGATTO, 2010) ocasiona as diferenças nas manifestações clínicas (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001; ZINGALES et al., 2012) e a existência de cepas resistentes aos nitro derivados são fatores que dificultam o tratamento da doença (VELOSO et al., 2001).

As cepas Y, SIGR3 e SI8 são classificadas como TcII (RIMOLDI et al., 2012). A cepa QMII por ser DTU IIc (MARTINS et al., 2008) pode ser considerada segundo a classificação do consenso *Second Satellite Meeting* como TcIII (ZINGALES et al., 2009). A cepa SI1 ainda está em processo de caracterização; entretanto, pode-se supor que por haver sido encontrada na mesma região de SIGR3 e SI8, em Santo Inácio no estado da Bahia, possa pertencer ao mesmo grupo delas (TcII). A cepa Bolívia parece ser pertencente à linhagem II (ALVES et al., 2012), porém não se encontram dados atualizados na classificação dessa cepa em DTU.

Em estudos com camundongos a parasitemia e a mortalidade mostraram-se variadas. As cepas SIGR3 e SI8 apresentaram baixa parasitemia e mortalidade (RIMOLDI et al., 2012). No caso de Y, ocorreu baixa parasitemia, porém alta mortalidade (MARTÍNEZ-DÍAZ et al.,

2001). A parasitemia para QMII é alta, bem como a mortalidade (MARTINS et al., 2008). A cepa Bolívia causa alta parasitemia e moderada mortalidade (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001).

As diferenças entre as populações de *T. cruzi* mostraram que cada uma delas reage distintamente; embora Y, SIGR3 e SI8 sejam do mesmo grupo, observa-se que se comportam diferente perante um agente tripanossomicida. Uma correlação entre a mortalidade de camundongos (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001; MARTINS et al., 2008; RIMOLDI et al., 2012) e as suscetibilidades faz supor que as mais letais seriam as mais resistentes, no entanto isso não foi confirmado. Todos os compostos derivados de diaminas do ferroceno apresentaram atividade tripanossomicida maior que BZ, apesar das cepas demonstrarem suscetibilidades diferentes aos compostos. Por isso, a dificuldade na busca por uma substância que atinja a maioria das populações de *T. cruzi*. Diferentes mecanismos podem estar relacionados a esses distintos comportamentos de *T. cruzi* de metabolizar um agente com propriedades óxido redutoras.

Tem sido proposto que o sistema antioxidante de parasitos apresenta função principal no processo de pré adaptação ao ambiente oxidante durante a invasão celular (PIACENZA et al., 2009a).

Nogueira et al. (2009) demonstrou que houve aumento na expressão mTcTXNPx de *T. cruzi* apenas na cepa *in vitro* induzida. Dados na literatura indicam que em *T. cruzi*, cTcTXNPx nativa, apresenta polipeptídeo de 23 kDa e 46 kDa. Enquanto que mTcTXNPx nativa tem 25 kDa e 50 kDa. Em *T. cruzi*, TXNPx apresenta uma estrutura decamérica organizada em cinco homodímeros constituídos por duas subunidades que interagem para formar um dímero (PIÑEYRO et al., 2005). Os polipeptídeos reduzidos apresentam-se como monômeros, enquanto os oxidados como homodímeros; assim podem formar dímeros ou tetrâmeros (NOGUEIRA et al., 2009). A presença de mTcTXNPx de 50 kDa e cTcTXNPx de 46 kDa, ambas na forma oxidada (NOGUEIRA et al., 2009), não foram verificadas em amostras tratadas com mercaptoetanol (WILKINSON et al., 2000; PIÑEYRO et al., 2008) que provavelmente impediu a formação das pontes dissulfeto, conseqüentemente não ocorreu a dimerização.

No presente estudo, as amostras não foram tratadas com mercaptoetanol ao serem preparadas para a eletroforese, o que pode ter influenciado na dimerização, formando-se os polipeptídios oxidados (homodímeros). Entretanto, adicionou-se DTT antes da eletroforese, que, provavelmente, não produziu uma ação suficiente para romper todas as pontes dissulfeto e por isso ocorreu à dimerização.

Era esperada a formação de banda de 25,5 kDa, porém não ocorreu. Essa banda não foi possível de ser detectada, provavelmente devido à baixa expressão dessa proteína. As outras proteínas (bandas entre 30 kDa, 46 kDa e 58 kDa) reconhecidas pelo anticorpo anti mTcTXNPx podem ser os dímeros de mTcTXNPx e a forma citosólica. Chama atenção é que a banda de 25,5 kDa apareceu apenas no tratamento com BZ para a cepa Y. Outro fato é que nesse caso houve aumento na expressão da proteína ao se comparar o tratamento de 6 horas em relação a 24 horas. Esse comportamento não foi verificado para outras cepas.

Dados na literatura tem demonstrado que há diferença de expressão em cepas induzidas *in vitro* e *in vivo* à resistência ao BZ. Até então, parece ocorrer aumento na expressão de mTcTXNPx em cepas induzidas *in vitro*; também houve aumento no nível de RNAm de mTcTXNPx, embora o gene não tenha sido amplificado no genoma do parasito resistente ao BZ (NOGUEIRA et al., 2009). Em estudo realizado com cTcTXNPx, na cepa induzida *in vitro* à resistência ao H₂O₂, mostrou-se que é importante realizar uma indução prévia à resistência. Neste caso, também as cepas *in vitro* resistentes expressaram mais cTcTXNPx (FINZI et al., 2004).

No presente trabalho, testaram-se linhagens naturalmente resistentes, que não foram previamente induzidas à resistência ao BZ ou às substâncias AAC04, AAC09 e AAC10. Então, provavelmente, por essa razão não houve mais expressão de mTcTXNPx. Além disso, outro aspecto que pode ter ocorrido, foi a variabilidade genética entre as cepas utilizadas neste trabalho e as descritas na literatura.

Segundo Murta et al. (2006) cepas selecionadas *in vivo* e naturalmente resistentes aumentam o nível de expressão de cTcOYE quando expostas ao BZ. No genoma de *T. cruzi* existe mais de uma cópia para o gene da enzima; entretanto, em cepas resistentes selecionadas *in vitro* foi observada a perda dessas cópias, restando apenas uma. Tal fato parece influenciar a expressão da proteína, gerando uma menor produção de cTcOYE, o que poderia ser considerado um mecanismo de escape devido a uma menor produção de PGF_{2α}, que parece estar envolvida no metabolismo do BZ, que produz ânions de radicais tóxicos.

Esse mesmo mecanismo de escape tem sido observado em *E. histolytica* resistente ao metronidazol (derivado de nitroimidazol, similar ao BZ) que reduz o nível da atividade de flavina redutase (MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). *E. histolytica*, transfectada para aumentar a expressão da enzima, tornou-se mais sensível à exposição ao metronidazol. Mutações que inativam o gene (*frxA*) de NADPH flavina oxidoreductase têm sido relacionadas ao fenótipo resistente ao metronidazol em *Helicobacter pylori* (MURTA et al., 2006).

A ausência de aumento na expressão de cTcOYE nas cepas empregadas neste estudo pode estar relacionado ao fato de que são cepas não previamente induzidas à resistência ao BZ e aos derivados de diaminas do ferroceno. O que pode ter ocorrido também é que as cepas utilizadas apresentem uma cópia a menos do gene cTcOYE. Mais estudos serão necessários para verificar se houve a perda desse gene e a identificação das proteínas referentes às outras bandas formadas, pois o anticorpo anti cTcOYE reconheceu proteínas de outros tamanhos (bandas entre 46 kDa, 58 kDa e 175 kDa), que podem compartilhar epítomos. Embora não tenha sido relatado na literatura, pode ser que ocorra o mesmo que em TXNPx, e, então, as outras proteínas visualizadas nos *blottings* seriam as isoformas de cTcOYE. Era esperado a formação de banda de 43 kDa que não apareceu. Novamente pode ter ocorrido com cTcOYE o mesmo que aconteceu com mTcTXNPx, isto é, não foi possível detectar a banda. Provavelmente devido à baixa expressão dessa proteína (NOGUEIRA et al., 2009) ou deleção do gene (MURTA et al., 2006).

Apesar da indução prévia *in vitro* ou *in vivo* aumentar a resistência ao BZ, é provável que a aquisição de resistência ao BZ seja um complexo processo de múltiplos estágios (MURTA et al., 2006). O mecanismo de resistência ao BZ ainda não está totalmente esclarecido. A resistência ao BZ e substâncias tripanossomicidas pode estar relacionada com o aumento na expressão de genes devido à amplificação do genoma (NOGUEIRA et al., 2006). Porém, pode haver aumento no nível de mRNA e proteína, mas sem amplificação do genoma (NOGUEIRA et al., 2009). Outros estudos indicam haver perda de gene em cepa resistente, ao invés de amplificar (MURTA et al., 2006).

As proteínas mTcTXNPx de 25,5 kDa e cTcOYE de 43 kDa não tiveram suas expressões aumentadas nas cepas mais resistentes às substâncias tripanossomicidas como era esperado. Os resultados obtidos mostraram uma baixa expressão dessas enzimas, exceto para a cepa Y no tratamento com BZ, em que houve aumento na expressão de mTcTXNPx. A menor expressão de mTcTXNPx e cTcOYE pode ser porque as cepas utilizadas neste trabalho não foram induzidas à resistência aos derivados de diaminas do ferroceno e BZ; bem como a enorme diversidade genética entre as populações de *T. cruzi*. Tendo em conta a diversidade genética e mecanismos variados que *T. cruzi* apresenta na tentativa de evitar a ação de ERO, o parasito pode expressar diferencialmente as enzimas que atuam sobre o sistema antioxidante, e não depender apenas de mTcTXNPx e cTcOYE. Portanto, nem sempre o aumento na expressão de mTcTXNPx e cTcOYE indica o aumento na resistência ao BZ e agentes tripanossomicidas, mesmo em linhagens naturalmente resistentes ou *in vitro* ou *in vivo* induzidas.

A associação de monômeros de mTcTXNPx poderia ser alternativa na tentativa de detoxificar ERO. Assim seriam formados mais dímeros, consequentemente haveria menor quantidade de monômeros, por isso a impressão de menor expressão de mTcTXNPx detectada pelo método empregado para avaliar diferenças na expressão dessa enzima. Segundo Nogueira e et al. (2009), também houve aumento na expressão de dímeros de mTcTXNPx em relação ao monômero na cepa resistente ao BZ. O mesmo poderia também ter ocorrido para cTcOYE.

Pode-se supor que a dificuldade dos parasitos (cepas Bolívia, SI1, SIGR3, SI8 e QMII) expressarem as enzimas mTcTXNPx e cTcOYE nos tratamentos com substância AAC09, pois a expressão foi detectada somente na cepa Y, tenha relação com o fato de que foi a mais tóxica, como indicado pelos seus respectivos valores de CI_{50} ; por isso a dificuldade de *T. cruzi* em expressar as enzimas.

Nota-se que nas reações entre os anticorpos anti rmTcSOD e rcTcOYE aparecem outras bandas, o que não ocorre com rmTcTXNPx. Possivelmente, nas purificações de mTcSOD e cTcOYE haviam outras bandas, que não apareceram em mTcTXNPx, no qual havia apenas uma banda. Como as bandas foram recortadas do gel, esperava-se reconhecimento das bandas de 24 kDa e 43 kDa, respectivamente, para rmTcSOD e rcTcOYE. Mais bandas também apareceram nas reações entre os anticorpos de mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE com as proteínas nativas presentes nos extratos totais. Possivelmente podem ser isoformas como alguns estudos tem demonstrado (PIÑEYRO et al., 2005; MATEO et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2009) e não simplesmente inespecificidade dos anticorpos. Por apresentarem estrutura parecida, provavelmente o epítopo seria o mesmo e ligaram-se ao níquel da coluna de purificação; por isso podem ter sido eluídas juntas.

Testes enzimáticos para analisar a reatividade e a inibição colaborariam na avaliação dessas enzimas e da presença de isoformas. Para tanto seria necessária uma repurificação prévia dessas amostras no intuito de obter frações isoladas, e com isso, prosseguir com os ensaios enzimáticos e dados de espectrometria de massa.

As propriedades óxido redutoras do ferroceno podem estar envolvidas na atividade tripanossomicida observada neste estudo; a substância AAC09 pode ser um candidato para novos estudos. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que a diferença na susceptibilidade é um grande problema na busca por uma molécula de ampla ação tripanossomicida. Portanto, é importante um estudo que integre as vias oxidativas e as enzimas que são expressas em cepas naturalmente sensíveis e resistentes e as induzidas *in vitro* e *in vivo* à resistência e em modelos *in vivo*.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Os valores da CI_{50} indicam que cada cepa se comporta de modo diferente após o tratamento com as substâncias, por isso a dificuldade em se obter substâncias tripanossomicidas para a maioria das populações de *T. cruzi*;

- Dados obtidos a partir dos valores de CI_{50} e IS indicaram que a substância AAC09 apresenta potencial tripanossomicida a ser investigado em outras formas do parasito e em modelos *in vivo*. Provavelmente a maior citotoxicidade dessa substância seja devido ao grupo metóxi e a ausência do grupo desativador na molécula que permitiram maior reatividade do ferroceno;

- Parece que cloro ligado a anel aromático aumenta a lipofilicidade da molécula, uma vez que a substância AAC10 demonstrou-se mais tóxica que AAC04. Porém, apesar de ter sido menos tóxica, a substância AAC04 apresentou maior interferência na expressão de mTcTXNPx e cTcOYE;

- Os anticorpos policlonais anti mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE reagiram com as proteínas nativas específicas, presentes no extrato total, com pesos moleculares esperados, aproximadamente, 25,5, 24 e 43 kDa, respectivamente;

- As cepas expressam diferentemente as enzimas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE; porém não se pode afirmar que a cepa mais resistente expresse mais enzimas; assim *T. cruzi* pode apresentar mecanismos distintos para interagir com ERO e não apenas superexpressão dessas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo;

- Parece que a realização de prévia indução *in vitro* é um fator importante no aumento da expressão de mTcTXNPx, enquanto que para cTcOYE existe tendência a não aumentar a expressão, pois nos processos de redução de substâncias tripanossomicidas por cTcOYE ocorre a geração do ânion superóxido. No presente estudo foram utilizadas cepas não induzidas à resistência aos derivados de diaminas do ferroceno e BZ, por isso o não aumento na expressão de mTcTXNPx. Também cTcOYE não aumentou a expressão nas cepas mais

resistentes, possivelmente devido ao meio de escape de *T. cruzi* para não aumentar a produção do tóxico ânion superóxido;

- Os anticorpos reconheceram proteínas de outros tamanhos que podem ser as isoformas das enzimas, por isso é importante mais estudos na caracterização e identificação desses polipeptídios reconhecidos pelos anticorpos;

- Novas pesquisas com outras formas de *T. cruzi* devem ser realizados, no intuito de auxiliar na busca de um fármaco mais adequado a cada paciente chagásico crônico.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVES, R. T. M.; REGASINI, L. O.; FUNARI, C. S.; YOUNG, M. C. M.; RIMOLDI, A.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA ROSA, J. A. Trypanocidal activity of brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 528-533, 2012.
- ANDRADE, H. M.; MURTA, S. M. F.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉ, P.; ROMANHA, A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benzonidazole. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 2357-2367, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASTOS, C. J. C.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P.; DE JESUS, R. S.; FREIRE, M. S.; DE ARAÚJO, E. G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M. F. R. Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 1-6, 2010.
- BATISTA, D. G. J.; PACHECO, G. O.; KUMAR, A.; BRANOWSKA, D.; ISMAIL, M. A.; HU, L.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 137, p. 251-259, 2010.
- BERN, C. Chagas disease in the immunosuppressed host. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 450-457, 2012.
- BHATIA, V.; WEN, J.; ZACKS, M. A.; GARG, N. J. American trypanosomiasis. In: BARRETT, A. D. T.; STRANBERRY, L. **Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases**. London, UK: Elsevier, 2009. cap. 69, p. 1423-1450.
- BIOT, C.; GLORIAN, G.; MACIEJEWSKI, A.; BROCARD, J. S. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene-chloroquine analogue. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 23, p. 3715-3718, 1997.
- BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.
- CAMINOS, A. P.; PANOZZO-ZENERE, E. A.; WILKINSON, S. R.; TEKWANI, B. L.; LABADIE, G. R. Synthesis and antikinoplastid activity of a series of N,N'-substituted diamines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 1712-1715, 2012.
- CASTRO, H.; TOMAS, A. M. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, p. 1593-1606, 2008.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAVAIN, N.; VEZIN, H.; DIVE, D.; TOUATI, N.; PAUL, J. F.; BUISINE, E.; BIOT, C. Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 5, p. 710-716, 2008.

CHIARI, B. G.; MARTINI, P. C.; MORAES, J. D. D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M. A.; CICALLELLI, R. M. B.; ISAAC, V. L. B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v. 2, p. 08-14, 2012.

CORTI, M.; VILLAFANE, M. F. AIDS and Chagas disease. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research**. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier, 2010, cap.29, p. 793-808.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICALLELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potencial anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002. Supplementum 1.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature Outlook**, v. 465, p. S6-S7, 2010.

DE ALMEIDA, E. A.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CORREIA, D.; SHIKANAI-YASUDA, A. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980 - 2010). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 762-770, 2011.

DE DIEGO, J.; PUNZON, C.; DUARTE, M.; FRESNO, M. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. **The American Association of Immunologists**, v. 159, p. 4983-4889, 1997.

DE KONING, H. P. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 586-592, 2001.

DELHAES, L.; ABESSOLO, H.; BIOT, C.; BERRY, L.; DELCOURT, P.; MACIEJEWSKI, L.; BROCARD, J.; CAMUS, D.; DIVE, D. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of ferrochloquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. **Parasitology Research**, v. 87, p. 239-244, 2001.

DE SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 7, p. 90-94.

DE SOUZA, E. M.; MENNA-BARRETO, R.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; KUMAR, A.; HU, Q.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 133, p. 75-79, 2006.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex ? A review of the parasite diversity and the potencial of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n. 1, p. 1-12, 2003.

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

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: CIRMERMAN, B.; CIRMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 11, p. 81-94.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. The acidocalcisome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 151-159, 2001.

DOMARLE, O.; BLAMPAIN, G.; AGNANIET, H.; NZADIYABI, T.; LEBIBI, J.; BROCARD, J.; MACIEJEWSKI, L.; BIOT, C.; GEORGES, A. J.; MILLET, P. *In vitro* antimalarial activity of a new organometallic analog, ferrocene-chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 42, n. 3, p. 540-544, 1998.

DOS REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 84-90, 2011.

DUBAR, F.; KHALIFE, J.; BROCARD, J.; DIVE, D.; BIOT, C. Ferroquine an ingenious antimalarial-drug thoughts on the mechanism of action. **Molecules**, v. 13, p. 2900-2907, 2008.

EPTON, R.; HOBSON, M. E.; MARR, G. Enzyme catalysed oxidation of ferrocene compounds. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 134, p. C23-C26, 1977.

FERGUSON, M. A. J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 353, p. 1295-1302, 1997.

FERNANDES J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FINZI, J. K.; CHIAVEGATTO, C. W. M.; CORAT, K. F.; LOPEZ, J. A.; CABRERA, O. G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, p. 37-43, 2004.

FISH, R. H.; JAOUEN, G. Bioorganometallic chemistry: structural diversity of organometallic complexes with bioligands and molecular recognition studies of several supramolecular hosts with biomolecules, alkali-metal ions, and organometallic pharmaceuticals. **Organometallics**, v. 22, n. 11, p.2166-2177, 2003.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *T.cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, p. 75-81, 1974.

GOURBIÈRE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, p. 190-202, 2012.

GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1-8, 2009.

GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 673-685, 2009.

HARDER, S.; BENTE, M.; ISERMANN, K.; BRUCHHAUS, I. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 5, p. 861-870, 2006.

HEILMANN, J. B.; HILLARD, E. A.; PLAMONT, M.; PIGEON, P.; BOLTE, M.; JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A. Ferrocenyl compounds possessing protected phenol and thiophenol groups: synthesis, X-ray structure, and *in vitro* biological effects against breast cancer. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 693, p. 1716-1722, 2008.

HILLARD, E.; VESSIÈRES, A.; THOUIN, L.; JAOUEN G.; AMATORE, C. Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 285-290, 2006.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of mammals**: a zoological monograph. Bristol, Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 613-643.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018-1027, 2007.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHÉ, L. RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 733-742, 2008.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 95-97, 2007. Supplementum 1.

JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American Trypanosomiasis**: Chagas Disease one hundred years of research. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier, 2010, cap. 11, p. 249-276.

JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A. Bioorganometallic chemistry: a future direction for transition metal organometallic chemistry? **American Chemical Society**, v. 26, p. 361-369, 1993.

JAVITT, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 161-168, 1990.

KOHATSU, A. A. N. **Avaliação do metabolismo oxidativo em cepas de *Trypanosoma cruzi* naturalmente resistentes ao benzonidazol**. 2009. 93 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Instituto de Biociências, Rio Claro, 2009.

KOHATSU, A. A. N.; DA SILVA, M. T. A.; RIMOLDI, A.; DA ROSA, J. A.; SILVA, F. A. J.; VARGAS, M. D.; CICARELLI, R. M. B. Evaluation of chemical structures of ferrocene diamines on the oxidative metabolism in *Trypanosoma cruzi* strains. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 27. 2011/ ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGA'S DISEASE, 38., 2011, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 2011. p.66.

KUBATA, B. K.; DUSZENKO, M.; KABUTUTU, Z.; RAWER, M.; SZALLIES, A.; FUJIMORI, K.; INUI, T.; NOZAKI, T.; YAMASHITA, K.; HORII, T.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Identification of a novel prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthase in *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 1327-1337, 2000.

KUBATA, B. K.; KABUTUTU, Z.; NOZAKI, T.; MUNDAY, C. J.; FUKUZUMI, S.; OHKUBO, K.; LAZARUS, M.; MARUYAMA, T.; MARTIN, S. K.; DUSZENKO, M.; URADE, Y. A key role for *old yellow enzyme* in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 9, p. 1241-1251, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEWIS, M. D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* : systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 9, p. 1041-1049, 2009.

LIU, Y.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D. Sequence and length dependent thermodynamic differences in heterocyclic diamidine interactions at AT base pairs in the DNA minor groove. **Biophysical Chemistry**, v. 131, p. 1-14, 2007.

MACEDO, A. M.; SEGATTO, M. Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American Trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research**. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier, 2010, cap. 20, p. 489-522.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 53-59, 2001. Supplementum 1.

MARTINS, L. P.; MARCILI, A.; CASTANHO, R. E.; THEREZO, A. L.; OLIVEIRA, J. C.; SUZUKI, R. B.; TEIXEIRA, M. M.; ROSA, J. A.; SPERANÇA, M. A. Rural *Triatoma rubrovaria* from Southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 427-434, 2008.

MATEO, H.; MARÍN, C.; PÉREZ-CORDÓN, G.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 271-276, 2008. Supplmentum 3.

MATHIS, A. M.; HOLMAN, J. L.; STURK, L. M.; ISMAIL, M. A.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in african trypanosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2185-2191, 2006.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, part A, p. 601-620, 2007.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 20, p. 329-340, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R.; KRAUTH- SIEGEL, R. L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 7, p. 320-328, 2003.

MURTA, S. M. F.; KRIEGER, M. A.; MONTENEGRO, L. R.; CAMPOS, F. F. M.; PROBST, C. M.; ÁVILA, A. R.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; NIRDÉ, P.; BRUNA-ROMERO, O.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P) flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benzonidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 151-162, 2006.

MURTA S. M.; NOGUEIRA F. B.; DOS SANTOS P. F.; CAMPOS F. M.; VOLPE C.; LIARTE D. B.; NIRDÉ P.; PROBST C. M.; KRIEGER M. A.; GOLDENBERG S.; ROMANHA A. J. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Acta Tropica**, v. 107, p. 59-65, 2008.

NEUSE, E. W. Macromolecular ferrocene compounds as câncer drug models. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 15, n. 1, p. 3-32, 2005.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. **Gene Doc**: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments Version 2.6.002, 1997.

NOGUEIRA, F. B.; KRIEGER, M. A.; NIRDÉ, P.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. F. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benzonidazole. **Acta Tropica**, v. 100, p. 119-132, 2006.

- NOGUEIRA, F. B.; RUIZ, J. C.; ROBELLO, C.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. F. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benzonidazole. **Parasitology Research**, v. 104, p. 835-844, 2009.
- OSELLA, D.; FERRALI, M.; ZANELLO, P.; LASCHI, F.; FONTANI, M.; NERVI, C.; CAVIGIOLIO, G. On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives. **Inorganica Chimica Acta**, v. 306, p. 42-48, 2000.
- PARODI-TALICE, A.; DURÁN, R.; ARRAMBIDE, N.; PRIETO, V.; PIÑEYRO, M. D.; PRITSCH, O.; CAYOTA, A.; CERVENANSKY, C.; ROBELLO, C. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 881-886, 2004.
- PASSERINI, G. D. **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Instituto de Química, Araraquara, 2008.
- PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemical Journal**, v. 403, p. 323-334, 2007.
- PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochemical Journal**, v. 410, p. 359-368, 2008.
- PIACENZA, L.; ZAGO, M. P.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; BASOMBRI, M. A.; RADI, R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1455-1464, 2009a.
- PIACENZA, L.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; RADI, R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 415-421, 2009b.
- PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTÍNEZ, A.; RADI, R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxidant Redox Signal**, v. 20, p. 01-12, 2012.
- PIÑEYRO, M. D.; PIZARRO, J. C.; LEMA, F.; PRITSCH, O.; CAYOTA, A.; BENTLEY, G. A.; ROBELLO, C. Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Structural Biology**, v. 150, p. 11-22, 2005.
- PIÑEYRO, M. D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**, v. 408, p. 45-50, 2008.

QUIJANO-HERNANDEZ, I.; DUMONTEIL, E. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. **Human Vaccines**, v. 7, p. 1184-1191, 2011.

RALAMBOMANANA, D. A.; RAZAFIMAHEFA-RAMILISON, D.; RAKOTOHOVA, J. M.; PÉLINSKI, L. Syntesis and antitubercular activity of ferrocenyl diaminoalcohols and diamines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9546-9553, 2008.

RIBEIRO, R. D.; RISSATO e GARCIA, T. A.; BONOMO, W. C. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 51-54, 1987.

RIMOLDI, A.; ALVES, R. T.; AMBRÓSIO, D. L.; FERNANDES, M. Z. T.; MARTINEZ, I.; DE ARAÚJO, R. F.; CICARELLI, R. M. B.; DA ROSA, J. A. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. **Parasitology**, v. 139, p. 37-44, 2012.

ROSA J. A.; PINTO M. C.; FERNANDES M. Z. T.; MARTINEZ I.; ABREU K.; ABREU K. A.; SPERANZA L.; VARGAS, S. F. S. Isolation of *Trypanosoma cruzi* strains from *Triatoma sordida* collected in peridomestic environment in Santo Inácio, Bahia. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 20., 2004/ ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE, 31., 2004, Caxambu, MG, Brazil, Nov 8-10, 2004. p.156.

SCHATZSCHNEIDER, U.; METZLER-NOLTE, N. New principles in medicinal organometallic chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 1504-1507, 2006.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007. Supplementum 1.

SCHMUNIS G.A.; YADON Z.E. Chagas disease: A latin american health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p. 14-21, 2010.

SHARMA, V.; PIWNICA-WORMS, D. Metal complexes for therapy and diagnosis of drug resistance. **Chemical Reviews**, v. 9, n. 99, p. 2545-2560, 1999.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Emerging Infections**, v. 54, p.845-852, 2012.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 21-30, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos - Grupo Editorial Nacional, 2009. p. 616 - 620.

STEENKAMP D. J. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the Trypanosomatids. **Antioxidant Redox Signal**, v. 4, p. 105-21, 2002.

STEINDEL, M.; PACHECO, L. K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. F.; PINTO, C. J. C.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina state, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25-32, 2008.

TEIXEIRA, S. M.; DE PAIVA, R. M. C.; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DA ROCHA, W. D. Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1-17, 2012.

TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 96, p. 167-176, 1998.

TURRENS J. F. Oxidative stress and antioxidants defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211-20, 2004.

UCHIYAMA, N.; KABUTUTU, Z.; KUBATA, B. K.; KIUCHI, F.; ITO, M.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T.; OHKUBO, K.; FUKUZUMI, S.; MARTIN, S. K.; HONDA, G.; URADE, Y. Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5123-5126, 2005.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2010.

VAN STAVEREN, D.; METZLER-NOLTE, N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 5931-5985, 2004.

VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J. O.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 1005-1011, 2001.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEB cutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3688-3691, 2003.

WASS, J. A. Origin 7.0. **Biotech Software and Internet Report**, v. 3, n. 5/6 p. 130-133, 2002.

WASSMANN, C.; HELLBERG, A.; TANNICH, E.; BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26051-26056, 1999.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 1035-1042, 2003.

WILKINSON, S. R.; TEMPERTON, N. J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J. M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxidase metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 8820-8825, 2000.

WILLIAMS, R. E.; BRUCE, N. C. New uses for an old enzyme: the old yellow enzyme family of flavoenzymes. **Microbiology**, v. 148, p. 1607-1614, 2002.

WILSON, W. D.; TANIOUS, F. A.; MATHIS, A.; TEVIS, D.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W. Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie**, v. 90, n. 7, p. 999-1014, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**: first WHO report on neglected tropical diseases. 2010, pte 2, p.75-81.

WU, X.; TIEKINK, E. R. T.; KOSTETSKI, I.; KOCHERGINSKY, N.; TAN, A. L.; KHOO, S. B.; WILAIRAT, P.; GO, M. L. Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: investigations into the role of ferrocene. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 175-187, 2006.

YAMAGUCHI, K.; OKAMOTO, N.; TOKUOKA, K.; SUGIYAMA, S.; UCHIYAMA, N.; MATSUMURA, H.; INAKA, K.; URADE, Y.; INOUE, T. Structure of the inhibitor complex of old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 18, p. 66-69, 2011.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase mutigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M. MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; MAIA, M. C. P.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 449-456, 2011.