

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia

FLÁVIA ALVES DE JESUS SILVA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM CEPA Y
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* TRATADAS COM O COMPOSTO
DERIVADO DO BENZOFUROXÂNICO LAPDESF - BZFS**

ARARAQUARA
2015

Ficha Catalográfica

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

S586a Silva, Flávia Alves de Jesus
Avaliação do metabolismo oxidativo em cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratadas com o composto derivado benzofuroxânico LAPDESP - BZFS / Flávia Alves de Jesus Silva. – Araraquara, 2015
65 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli
1. Regina Maria Barretto Cicarelli. 2. estresse oxidativo. 3. Benzofuroxânico. I. Cicarelli, Regina Maria Barretto, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Avaliação do metabolismo oxidativo em cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratadas com o composto derivado do benzofuroxânico LAPDESF-BZFS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA, em PARASITOLOGIA,
Curso de MESTRADO.

Orientanda: Flávia Alves de Jesus Silva

Orientadora: Prof(a). Dr(a) Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente ao meu esposo Elias e a minha filha Camila. Ao Elias, que mais que um esposo foi o meu amigo e confidente, agradeço a sua confiança e a sua dedicação para que esse sonho se concretize; agradeço a paciência das noites de sono mal dormidas me ouvindo falar sobre o trabalho, e Camila agradeço que mesmo tão pequena soube compreender e aceitar a minha ausência em determinados momentos, onde o seu sorriso depois de um dia turbulento sempre me incentivou a seguir em frente. Além da dedicatória desta conquista, dedico todo meu amor e a minha vida a vocês.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por iluminar sempre o meu caminho, me proporcionando saúde e sabedoria para saber buscar sempre mais conhecimento.

Agradeço a toda minha família pelo tempo doado para a realização das pesquisas, pela imensa compreensão, em especial a minha filha Camila e meu esposo Elias, sem o apoio de vocês nada disso seria possível. A vocês a minha eterna gratidão.

A toda equipe do laboratório Fernanda, Isabela, Juliana e Danilo, pelos momentos compartilhados de alegrias, tristezas, angústia e ansiedade, mas que sempre estiveram ao meu lado oferecendo seus carinhos, sempre me apoiando e ajudando. Agradeço especialmente a Andréa, que ajudou desde o desenvolvimento teórico do projeto até a sua conclusão final, muito obrigada por sempre tirar minhas dúvidas e me apontar soluções quando tudo parecia estar perdido. A você dedico este trabalho e minha eterna gratidão.

Agradeço também a minha Orientadora, Profa. Dra Regina Cicarelli, por dedicar seu tempo a me ensinar um pouco do muito que ela sabe. Serei sempre grata por sua confiança, compreensão e paciência. Tenho um imenso orgulho em ter você como minha orientadora, e espero que essa parceria se mantenha por muitos outros projetos. A você minha professora, meu muito obrigado.

Agradeço também a Profa. Dra Chung Man Chin e a Dra Priscila Longhin Bosquesi pela parceria e confiança em ceder o composto para a realização desta dissertação. Agradeço também por sempre nos atender quando precisamos de amostras. Muito obrigada por tudo.

A estes dedico este trabalho, sem a ajuda e compressão de todos a realização deste sonho não seria possível.

Muito obrigada por tudo!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO (ABSTRACT)

RESUMO

A tripanossomíase Americana, mais conhecida por doença de Chagas, é transmitida por triatomíneos infectados pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi*. Desde que foi descrita pela primeira vez em 1909, a doença tem se expandido pelo mundo infectando milhões de pessoas, principalmente na América Latina, onde ela é endêmica. Atualmente, apenas dois fármacos estão disponíveis para o tratamento, o nifurtimox, que não é usado no Brasil, e o benzonidazol, que teve sua produção industrial bastante reduzida. No entanto, ambos os fármacos tem ações limitadas. Assim, a busca de novas substâncias e a compreensão do mecanismo de resistência aos fármacos tripanossomicidas disponíveis e aos que ainda estão em fase de pesquisa, tem sido motivo de vários estudos. Alguns estudos relatam um aumento na produção de enzimas que atuam na defesa celular, as quais, provavelmente, poderiam ser responsáveis pela resistência do parasito. Algumas enzimas têm funções importantes na sobrevivência e crescimento dos parasitos: superóxido dismutase (SOD), metaloenzima que elimina radicais superóxido ao convertê-los em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular; *old yellow enzyme* (OYE), uma NADPH flavina oxidoreductase que pode estar envolvida na redução de substâncias tripanossomicidas, e peroxiredoxina (Prx), que catalisa a redução de peróxidos. Por meio de *Western blotting* analisou-se as modificações em nível de expressão das enzimas SOD, OYE e Prx em cepas de *T. cruzi* tratadas ou não com um composto derivado benzofuroxânico, LAPDESF-BZFS (6-((metil)benzo[*c*](2-carbamoylidrazona)-1-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol). O IC₅₀ (índice de citotoxicidade) desse composto foi de 6,88 µg/mL, e promoveu alterações na expressão das enzimas Prx e OYE, provavelmente promovendo o estresse oxidativo em formas epimastigotas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; estresse oxidativo; benzofuroxânico; Prx; OYE.

ABSTRACT

The American trypanosomiasis, also known for Chagas disease, and transmitted for infected triatomine by etiological agent *Trypanosoma cruzi*. Since it was first described in 1909, this disease has expanded the world infecting millions of people, mostly in Latin America, where it is endemic. Currently only two drugs are available for Chagas disease treatment, nifurtimox, which is not used in Brazil, and benznidazole, which had its much reduced industrial production. However, both drugs have limited actions. Thus, the search for new compounds and to understand the mechanism of resistance to trypanocidal drugs available and that are still in the research phase, have been the subject of several studies. Some studies report an increase in the production of enzymes that action in cellular defense, which probably could be responsible for parasite resistance. Some enzymes have important functions in the survival and growth of parasites: superoxide dismutase (SOD), metalloenzyme that eliminates superoxide radicals to convert them hydrogen peroxide and molecular oxygen; old yellow enzyme (OYE) a NADPH- flavin oxidoreductase that may be involved in the reduction of trypanocidal substances and peroxiredoxin (Prx), which catalyzes the reduction of peroxides. By means of Western blotting analyzed for changes in expression level of SOD, Prx and OYE in strains of *T. cruzi* treated or not with a compound derived benzofuroxânico, LAPDESF-BZFS (6 - ((methyl) benzo [c] (2- carbamoilidrazona) -1 -N-oxide -1,2,5- oxadiazol). The CI50 (cytotoxicity index) of this compound was 6.88 µg/mL, and promoted changes in the expression of PRX and OYE enzymes, probably by promoting oxidative stress in epimastigotes .

Key words : *Trypanosoma cruzi*; oxidative stress; benzofuroxânico; Prx; OYE.

Figura 1: Estrutura tridimensional da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 2: Estrutura tridimensional da forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	18
Figura 3: Estrutura tridimensional da forma amastigota de <i>T. cruzi</i>	19
Figura 4: Distribuição geográfica de <i>T. cruzi</i> de acordo com a classificação por DTUs	20
Figura 5: Intercambio entre os ciclos domésticos, peridoméstico e silvestre.....	21
Figura 6: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	22
Figura 7: Ciclo de transmissão do <i>T. cruzi</i>	24
Figura 8: Movimento migratório da doença de Chagas	25
Figura 9: Sinal de Romaña na pálpebra de paciente picada por triatomíneo	26
Figura 10: Raio x de paciente na fase crônica da doença de Chagas, onde (a) Forma cardíaca, (b) mega esôfago e (c) mega colon.....	27
Figura 11: Estrutura química do núcleo benzofuroxânico (N-óxido-benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol)	33
Figura 12: Composto 6-((metil)benzo[c](2-carbamoilidrazona)-1-N-óxido-1,2,5-oxadiazol..	38
Figura 13: Fundamento do teste colorimétrico do MTT	41
Figura 14: Obtenção dos extratos totais de <i>T. cruzi</i> tratados e não tratados.....	42
Figura 15: <i>Western blotting</i> do extrato total (10 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com o derivado benzofuroxânico e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:600).....	49
Figura 16: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado com 0,1% Coomassie-Blue realizado para OYE com a concentração de 10 µg/poço de extratos.	50
Figura 17: <i>Western blotting</i> do extrato total (5 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com o derivado benzofuroxânico e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:500).....	51
Figura 18: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado com 0,1% Coomassie-Blue realizado para OYE com a concentração de 5 µg/poço de extratos.	51
Figura 19: <i>Western blotting</i> do extrato total (10 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratada com o derivado benzofuroxânico e revelado com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400)	52
Figura 20: Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 10% corado com 0,1% Coomassie-Blue realizado para mTcTXNPx com a concentração de 10 µg/poço de extratos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZ	Benzonidazol
⁰ C	Graus Celsius
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate</i>
CLFP	Cromatografia líquida rápida para proteínas
CO ₃ ^{•-}	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
g (FCR)	Força centrífuga relativa
h	Hora
IC ₅₀	Índice de citotocividade
IgG	Imunoglobulina G
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	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
O ₂	Oxigênio molecular
PBS	Tampão fosfato estéril
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</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 salina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1	14
2. INTRODUÇÃO	16
2.1. Família Trypanosomatidae	16
2.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	16
2.3. Ciclo biológico e transmissão	20
2.4. Sintomas e diagnóstico	25
2.5. A terapêutica	27
2.6. Prováveis proteínas de resistência do parasito	29
2.7. Planejamento de novos fármacos	32
2.7.1. Benzofuroxânico	33
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivos gerais	36
4.2. Objetivos específicos	36
4.2.1. Avaliação da suscetibilidade ao derivado benzofuroxânico LAPDESF-BZFS nas formas epimastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i> ;	36
4.2.2. Obtenção de extratos totais de <i>T. cruzi</i> após tratamento com o composto derivado benzofuroxânico LAPDESF-BZFS;	36
4.2.3. Avaliação por <i>Western blotting</i> do nível de expressão das proteínas mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE presentes nos extratos totais das cepas de <i>T. cruzi</i> tratadas e não tratadas com o composto derivado benzofuroxânico LAPDESF-BZFS.	36
5. MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1. Meio de cultura, soluções e géis	38
5.2. Cultivo de parasitas	39
5.3. Ensaio citotóxico de MTT	39
5.5. <i>Western Blotting</i>	42
6. RESULTADOS e DISCUSSÃO	45
6.1. Screening de extratos naturais e substâncias puras com potencial tripanossomicida	45
6.2. Teste colorimétrico do MTT	48
6.3. <i>Western blotting</i>	49
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. CAPÍTULO 1

2. INTRODUÇÃO

2.1. Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae, da ordem kinetoplastida, constitui um grupo de protozoários unicelulares, que inclui vários parasitas humanos responsáveis por doenças que afetam mais de 20 milhões de pessoas e incontáveis infecções em outros mamíferos, principalmente nos países em desenvolvimento (BARTHOLOMEU et al., 2014). Essa família possui como característica a presença do cinetoplasto, uma estrutura de nucleoproteína localizada na mitocôndria, adjacente ao corpo basal flagelar (APHASIZHEVA, 2013).

A importância médica da família Trypanosomatidae é cada vez maior devido ao grande impacto econômico na saúde pública, causado por espécies de *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas ou tripanossomíase americana), *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (doença do sono ou tripanossomíase africana), as quais causam cerca de 150.000 mortes por ano (BARTHOLOMEU et al., 2014; WHO, 2015). Além disso, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma brucei* são espécies patogênicas em animais, responsáveis por perdas na produção pecuária bastante consideráveis na América do Sul e países africanos (BARTHOLOMEU et al., 2014).

2.2. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

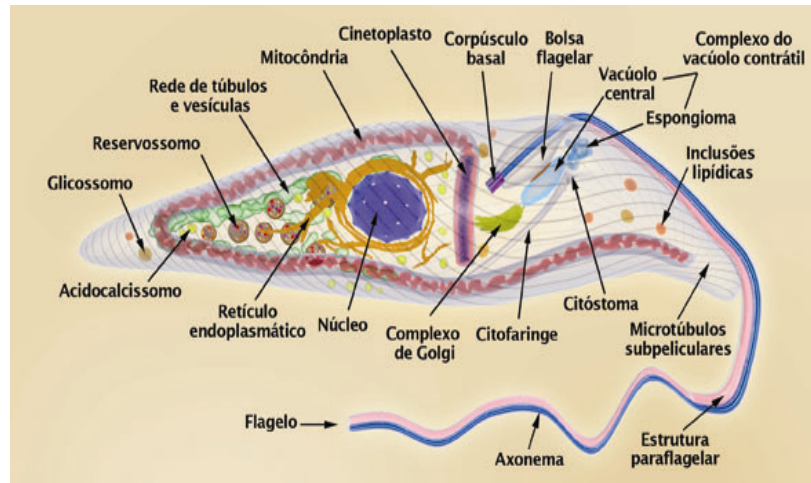
Trypanosoma cruzi é um parasita flagelado, o agente etiológico da doença de Chagas, capaz de infectar mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, como cães, gatos, gambás e tatus, e pode ser transmitido por mais de 140 espécies de insetos Hemiptera da subfamília Triatominae (Reduviidae) (OROZCO, 2013; GALVÃO, 2014; WHO, 2015). Este parasita e suas populações são caracterizadas por diversidade morfológica, comportamento biológico heterogêneo, alta variabilidade genética, e cursos clínicos distintos, o que dificulta a busca por novos fármacos tripanossomicidas (MORELO et al., 1994; DOST et al., 2002).

Seu ciclo de vida envolve obrigatoriamente a passagem por um hospedeiro intermediário, como o *Triatoma infestans* (barbeiro), para um definitivo, vertebrado, com estágios diferentes. Dependendo do hospedeiro em que se encontram, esses protozoários apresentam flagelo (epimastigota e tripomastigota) ou o flagelo não se exterioriza (amastigota) (COURA e BORGES-PEREIRA, 2012; CARNEIRO et al, 2015).

As formas epimastigotas apresentam o cinetoplasto próximo ao núcleo e a membrana ondulante; o flagelo surge à frente e próximo ao núcleo emergindo na extremidade anterior do parasita (DE SOUZA, 2000).

A figura 1 apresenta a estrutura da forma epimastigota tridimensional de *T. cruzi*.

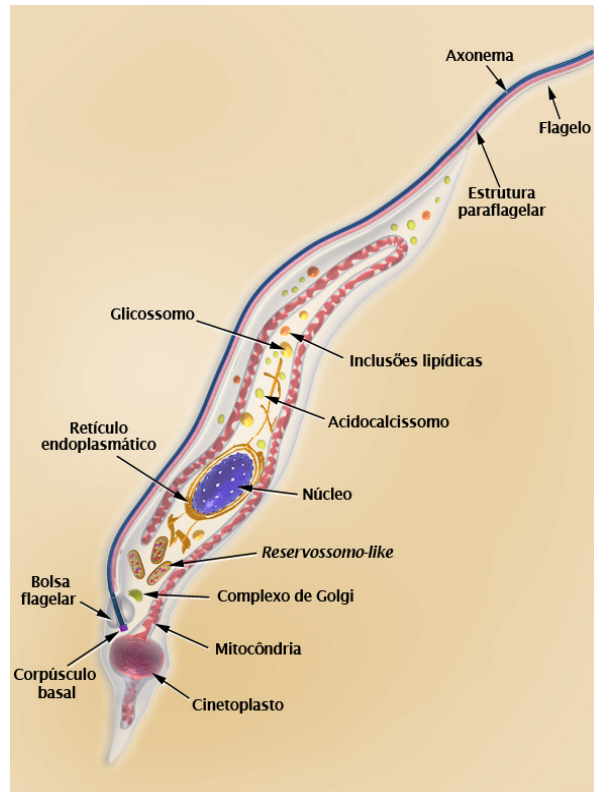
Figura 1: Esquema da estrutura tridimensional da forma epimastigota de *T. cruzi*



Fonte: Teixeira et al, 2012

A figura 2 apresenta a forma tridimensional da forma tripomastigota. Esta forma possui a membrana ondulante e o cinetoplasto posicionados entre o núcleo e a região posterior (Figura 2) (DE SOUZA, 2000).

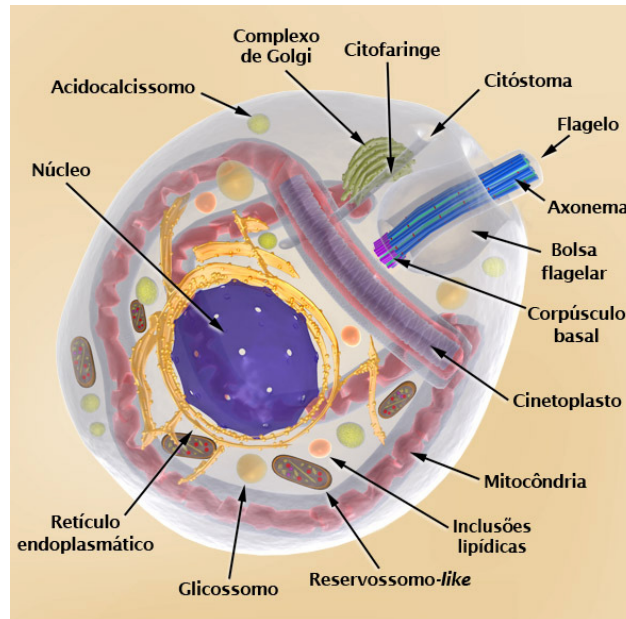
Figura 2: Estrutura tridimensional da forma tripomastigota de *T. cruzi*



Fonte: Teixeira et al, 2012

As formas amastigotas apresentam o núcleo grande, circular e excêntrico e o cinetoplasto bem visível, como pode ser observado na figura 3 (DE SOUZA, 2000).

Figura 3: Estrutura tridimensional da forma amastigota de *T. cruzi*



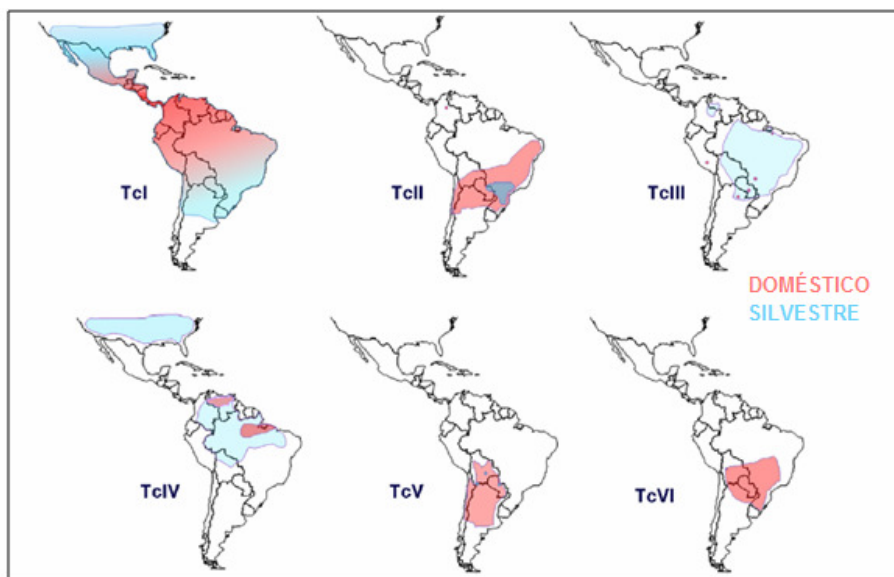
Fonte: Teixeira et al, 2012

Trypanosoma cruzi tem uma alta variabilidade genética descrita em seis distintas unidades, *Discrete Typing Units* (DTU). Cada uma das 6 DTUs, *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV), e *T. cruzi* VI (TcVI), apresentam características que determinam sua distribuição geográfica, associações epidemiológicas e manifestações clínicas da doença. A descrição de cada grupo é feita com base nas características que são geneticamente mais semelhantes entre si do que para qualquer outro grupo, e que são identificáveis por marcadores moleculares (ZINGALES et al, 2009; ZINGALES et al, 2012).

O parasita apresenta diferentes comportamentos tais como: parasitemia, genética, tropismo tissular, virulência e patogenicidade. Tais comportamentos diferenciam-se de acordo com o ciclo de transmissão do parasita, podendo ser selvagem ou doméstico. A figura 4 demonstra a distribuição geográfica das cepas, onde: na América do Sul indica que TcI é a DTU mais abundante e dispersa, pois é encontrada da América Central para o norte da América do Sul, e inclui casos crônicos de cardiomiopatia e casos graves de meningoencefalite. DTUs TcIII e TcIV foram predominantemente associadas ao ciclo silvestre na América do Sul, enquanto que TcV e TcVI estão relacionadas com o ciclo doméstico em partes do sul e centro da América do Sul. A maioria dos TcII, dentre elas a cepa Y foi encontrada em países sul-americanos, como o Brasil, Argentina e Chile, onde foi

predominantemente associada ao ciclo interno e com as formas graves da doença de Chagas crônica, incluindo manifestações cardíacas e digestivas (ZINGALES et al, 2009; ZINGALES et al, 2012).

Figura 4: Distribuição geográfica de *T. cruzi* de acordo com a classificação por DTUs



Fonte: Modificado de Zingales et al, 2012

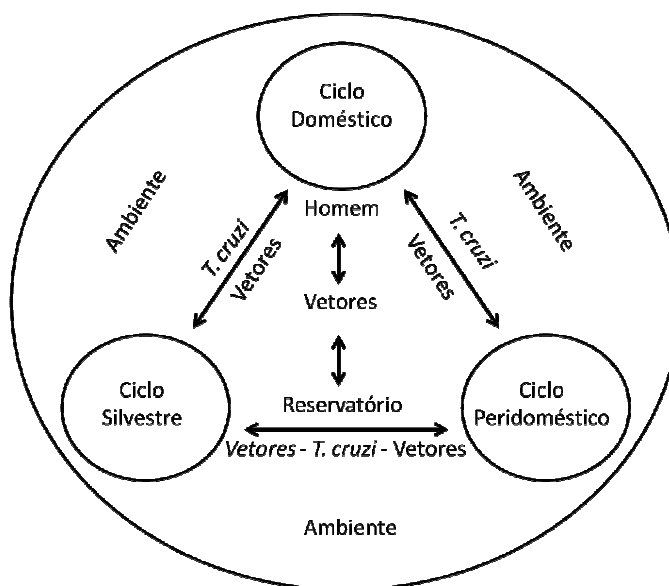
A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose que se estende dos Grandes Lagos na América do Norte ($\sim 42^{\circ}$ N) até o sudeste da Patagônia ($\sim 46^{\circ}$ S), ocorrendo amplamente na América Latina. Os países mais afetados são Brasil, Argentina, Chile, Colômbia e Venezuela (JANNIN e VILLA, 2007; MURTA et al., 2008).

2.3. Ciclo biológico e transmissão

O ciclo de vida do parasito alterna entre vertebrados (ordens *Marsupialia*, *Edentata*, *Chiroptera*, *Rodentia*, *Logomorpha*, *Artiodactyla*, *Carnívora* e *Primates*) e insetos vetores hematófagos (os principais gêneros são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e o *Rhodnius*), com diferenças principais nos estágios de desenvolvimento em cada hospedeiro e formas intra e extracelulares (JANNIN e VILLA, 2007; HOWARD et al., 2014; GOURBIÈRE et al., 2012). Como apresentado na figura 5, podem ser distinguidos três ciclos de transmissão: o silvestre, que ocorre entre vetores e reservatórios presentes nos ecótopos naturais; o peridoméstico, onde os animais parasitados vivem próximos das casas e podem ser sinantrópicos, como gambás e ratos; o doméstico, que apresenta animais domésticos e o homem como fonte de infecção, sendo os mamíferos de pequeno porte, que estão geralmente em contato com o ser

humano, os reservatórios importantes. Podem ser citados *Canis familiaris* (cão), *Felis domesticus* (gato) e animais por eles ingeridos que os podem infectar, *Rattus rattus* (rato comum), *Rattus norvegicus* (ratazana do esgoto), *Mus musculus* (camundongo) e *Cavia porcellus* (cobaia) (COURA, 2015a; COURA, 2015b).

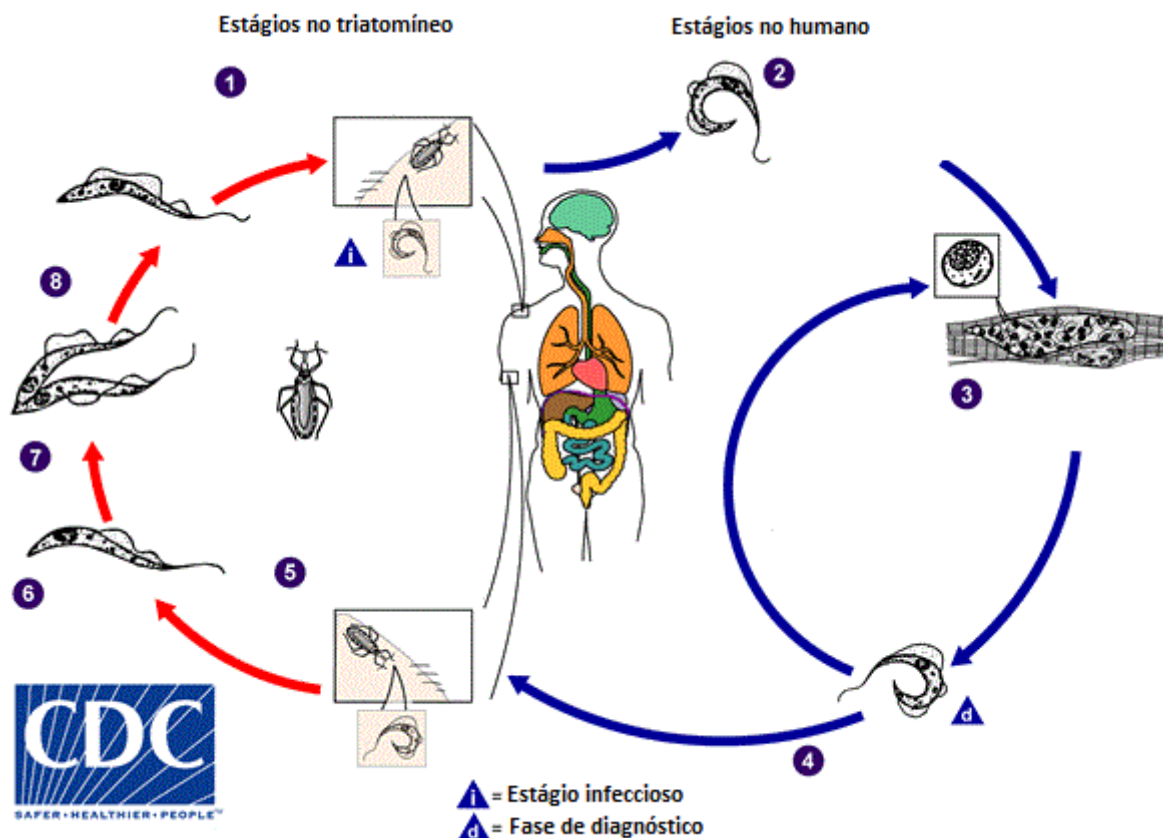
Figura 5: Intercambio entre os ciclos domésticos, peridoméstico e silvestre



Fonte: Modificado de Coura, 2009

As variações morfológicas e o ciclo de vida mostrados na figura 6, devem - se a uma adaptação aos distintos habitats e situações biológicas pelos quais passa o parasito (COURA e DIAS, 2009). As formas epimastigotas são as formas replicativas e móveis encontradas no vetor, ocorrendo nas porções iniciais ou médias do intestino e as formas de cultivo em meio de cultura. As formas tripomastigotas são as formas não replicativas, fusiformes e alongadas e infectante que, no hospedeiro vertebrado, ocorre no sangue. As formas amastigotas ocorrem no hospedeiro vertebrado, adotando a forma intracelular esférica ou ovalada que é a forma replicativa e não móvel (flagelo não exteriorizado). No citoplasma da célula parasitada, esta forma se multiplica por fissões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma. Após as sucessivas divisões, os amastigotas iniciam sua diferenciação passando por uma forma de transição, onde se transformam em tripomastigotas antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasita que invadirão outras células (LIMA, et al., 2010; YOSHIDA, 2008).

Figura 6: Ciclo biológico do *T. cruzi*. Onde: 1: Triatomíneo infectado deposita formas tripomastigotas na pele do mamífero; 2: na corrente sanguínea, tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas; 3: na célula do hospedeiros forma tripomastigota se diferenciam em amastigota e multiplicam se e se transformam novamente em tripomastigota sanguínea; 4: após romper a célula, formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea; 5: triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguínea do mamífero; 6: diferenciação em epimastigota; 7: multiplicação da forma; 8: diferenciação em tripomastigota metacíclica.



Fonte: Modificado de *Centers of Diseases Control and Prevention*
Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> ; acesso em 07/04/2015

Em humanos, um amplo espectro de manifestações clínicas é observado, sendo um possível reflexo da heterogeneidade entre *T. cruzi* isolados e/ou diferenças genéticas na resposta imune do hospedeiro. A virulência parece ser uma propriedade intrínseca de cada cepa; de fato, algumas cepas geralmente mantidas em laboratórios são caracterizadas como sendo de alta patogenicidade e baixa parasitemia (cepa Y) ou cepas com baixa patogenicidade e alta parasitemia (cepa Bolívia) (MARTINEZ-DÍAZ et al., 2001).

Essa heterogeneidade estrutural e bioquímica entre diferentes cepas podem modular a patogenicidade do *T. cruzi* (DOST et al., 2002).

A transmissão da enfermidade, além da vetorial, pode ser por transfusão de sangue, congênita, transplante de órgãos, acidental (geralmente em laboratórios ou em cirurgias de

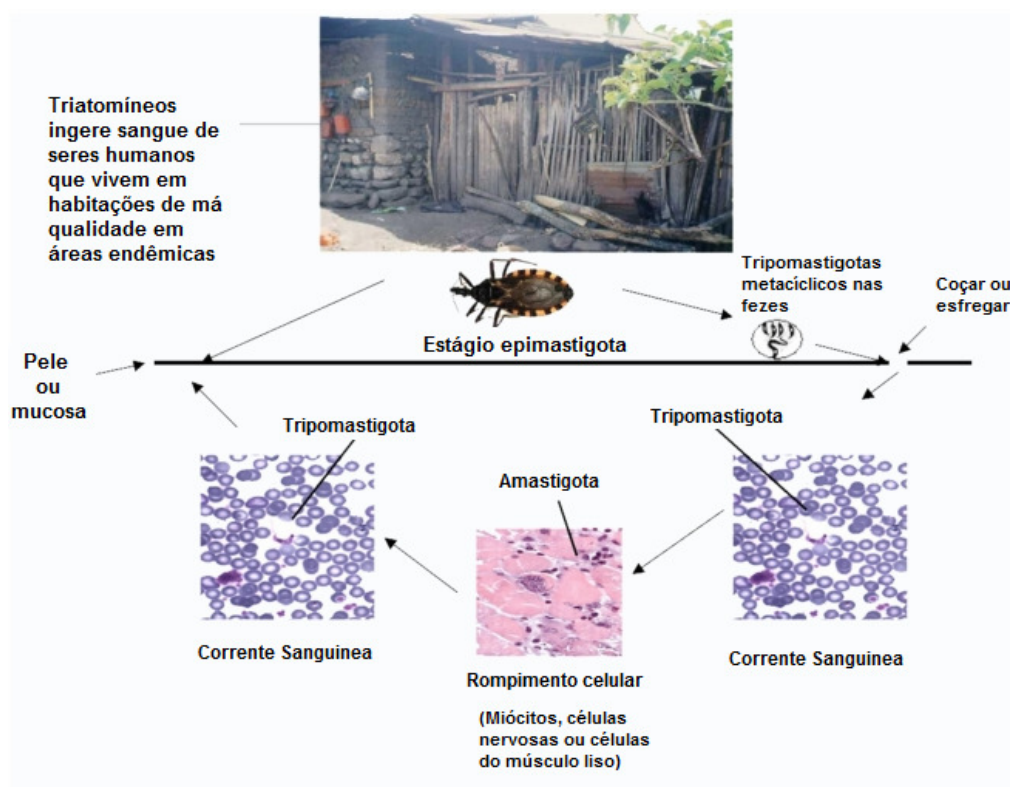
pacientes infectados) ou oral, que nos últimos anos vem se tornando cada vez mais comum, ocorrendo principalmente na região na Amazônia (SOSA-ESTANI e SEGURA, 2015; COURA, 2015b).

A transmissão transplacentária tem sido reportada nos países da América Latina (prevalência de 2,5 a 9,5%) (TEIXEIRA et al., 2006).

Nos últimos anos, a transmissão oral da doença de Chagas tem chamado a atenção, principalmente depois do surto ocorrido em Santa Catarina em 2005 (PEREIRA e NAZARRO, 2013). Porém, apesar da transmissão vetorial estar diminuindo em alguns países como Brasil, Chile e Uruguai (SOSA-ESTANI e SEGURA, 2015), esta transmissão é a mais comum, seguida por transfusão de sangue contaminado com *T. cruzi*, transmissão oral através de bebidas ou alimentos contaminados pelas fezes de triatomíneos e transmissão vertical e congênita que apesar de ser a mais incomum, de acordo com o ultimo levantamento da OMS, 2015, 1.125.000 mulheres em idade fértil estão infectadas com *T. cruzi* na América latina, sendo 8668 casos por ano, com cerca de 50% dos casos agrupados no México, Argentina e Colômbia (COURA et al, 2014; PEREIRA e NAZARRO, 2013).

Quando a doença foi descrita pela primeira vez em 1909 por Carlos Chagas, ele observou que a enfermidade era basicamente uma doença que afetava populações rurais extremamente pobres (figura 7), que viviam em moradias com péssimas condições de higiene, as quais permitiam uma condição ideal de domiciliação do inseto, favorecendo ainda mais a transmissão da doença (DIAS e SCHOFIELD, 1999).

Figura 7: Transmissão do *T. cruzi*



Fonte: Modificado de Franco-Parede et al, 2009

Devido à migração de indivíduos contaminados de áreas endêmicas para outros países, a transmissão por transfusão de sangue tornou-se uma ameaça, principalmente nos Estados Unidos, Canadá, Europa oriental, Austrália e Japão. Na figura 8, observa-se esse movimento migratório, o que segundo Coura e Viñas, 2010, contribuiu para a disseminação do *T. cruzi* para áreas onde o parasita não existia.

Figura 8: Movimento migratório da doença de Chagas



Fonte: Coura e Viñas, 2010.

Estima-se que existam de 7 a 8 milhões de pessoas que podem estar infectadas no mundo, principalmente nas áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2015).

2.4. Sintomas e diagnóstico

Existem duas fases durante o curso da doença de Chagas. A fase aguda inicia 6-10 dias após a infecção e tem a duração de cerca de 4-8 semanas. Nesta fase, cerca de 95% dos pacientes são assintomáticos. Nos casos sintomáticos, como na figura 9, observa-se a presença de sinal de Romaña (na conjuntiva) ou chagoma de inoculação (na pele) no local da picada, febre, dores nos músculos e nas juntas, sonolência, diarreia, edema, distúrbios respiratórios, cianose e até coma, podendo levar à morte (PEREIRA e NAZARRO, 2013). Essa fase caracteriza-se pela parasitemia elevada, que facilita o diagnóstico no exame direto do sangue. Aproximadamente dois meses após o início da fase aguda, a quantidade de parasita diminui, desaparecendo da corrente sanguínea, podendo ser detectado somente por exames especiais (xenodiagnóstico, hemocultura ou PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (BARRETT, et al., 2003).

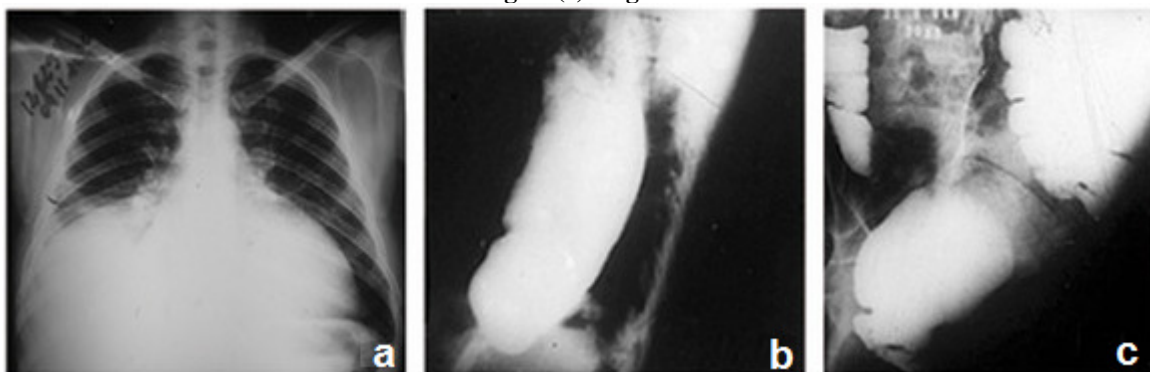
Figura 9: Sinal de Romaña na pálpebra de paciente picada por triatomíneo



Fonte: Rey, 1991

Eventualmente, parasita e hospedeiro chegam a um equilíbrio imunológico e a doença entra na fase crônica. Nesta fase, a parasitemia é grandemente reduzida e os pacientes tornam-se assintomáticos. Dependendo da área endêmica, na maioria dos pacientes, a doença permanece em um estado de latência da fase crônica (forma indeterminada) para o resto de suas vidas estes pacientes não desenvolvem quaisquer sintomas crônicos (BARRETT, et al., 2003). No entanto, 15-30% das pessoas infectadas entram na fase crônica sintomática da doença associado com a manifestação de lesões de órgãos como os mostrados na figura 10, podendo evoluir para três tipos principais de manifestações da fase crônica da doença: a) forma cardíaca, com miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita por arritmia cardíaca; b) forma digestiva, com megaesôfago e megacólon (aumento exagerado do esôfago ou cólon por contração dos esfíncteres correspondentes); c) forma mista com cardiopatia, megacólon e megaesôfago, simultaneamente (COURA e BORGES-PEREIRA, 2011). Estima-se que entre 20-30% dos pacientes com infecção irão apresentar algum tipo de evidência clínica (cardíaca, digestiva, neurológicas ou misto) (SOSA-ESTANI e SEGURA, 2015).

Figura 10: Raio X de paciente na fase crônica da doença de Chagas, onde (a) cardiomegalia, (b) mega esôfago e (c) mega colon.



Fonte: modificado de Coura e Viñas, 2010.

Para o diagnóstico da fase crônica são necessários testes mais sensíveis como xenodiagnóstico, hemocultura e testes imunológicos como hemaglutinação indireta (IHA), reação de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot. Os testes imunológicos podem apresentar reações cruzadas com outras infecções por kinetoplastidas e outras doenças como malária, toxoplasmose, tuberculose, entre outros; e com algumas condições de autoimunidade (artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, entre outros). Os diagnósticos podem também ser confirmados por reações de PCR. Para a confirmação do diagnóstico de doença de Chagas são necessários ao menos dois testes imunológicos positivos (TEIXEIRA et al., 2006; PEREIRA e NAZARRO, 2013).

2.5. A terapêutica

Os únicos medicamentos prescritos na prática médica para tratar a infecção são nifurtimox (NFX) e benzonidazol (BZ) (ANDRADE et al., 2008). Desde a década de 80, a comercialização de nifurtimox tem sido descontinuada, primeiro no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai. O modo de ação do nifurtimox envolve a geração do radical ânion superóxido por nitroredutases que, na presença de oxigênio, gera intermediários reativos (superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila) ao *T. cruzi*, parcialmente deficiente nos mecanismos de detoxificação de radicais livres, tornando-se suscetível aos intermediários (MAYA, et al, 2006).

O benzonidazol é reduzido no interior da célula, levando à formação de vários radicais intermediários de radicais livres e de metabólitos eletrofílicos, mas pouco se conhece sobre o efeito fisiológico (RAJÃO et al., 2014). Parece que sua ação envolve ligações covalentes ou outras interações de intermediários nitroreduzidos com componentes do parasita, ou ligações

com DNA, lipídeos e proteínas (COURA e CASTRO, 2002). Na fase aguda, o benzonidazol produz remissão rápida da febre (em 24 horas a 48 horas) e dos outros sintomas, ao mesmo tempo em que diminui a parasitemia. Em 10% dos casos, entretanto, mantém-se a parasitemia, sem que se saiba se a razão está em um déficit de absorção do fármaco ou na resistência de algumas linhagens de *T. cruzi* (COURA e BORGES-PEREIRA, 2011).

Ambos os medicamentos têm significantes efeitos adversos, provavelmente como consequência do dano oxidativo ou redutor nos tecidos dos hospedeiros. Entre os efeitos colaterais, incluem anorexia, vômito, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica; em alguns pacientes, esses sintomas podem levar à descontinuidade do tratamento (URBINA e DOCAMPO, 2003; COURA e BORGES-PEREIRA, 2012; PEREIRA e NAZARRO, 2013).

Na fase aguda da doença, deve-se iniciar o tratamento com o fármaco, o mais rápido possível, o que possibilita uma melhor ação contra as formas sanguíneas do parasito. No período inicial da fase crônica (de cinco a doze anos após a infecção inicial), os fármacos da fase aguda ainda são empregados. Para a fase crônica de maior duração, o tratamento tem sido indicado na forma indeterminada e nas formas cardíacas leves e digestivas (COURA e CASTRO, 2002).

A ação desses medicamentos é muito limitada, e a cura depende da fase da doença, da suscetibilidade da cepa de *T. cruzi*, das condições fisiológicas do hospedeiro, do período de tratamento, da dose e origem geográfica dos pacientes. Em adição, a terapêutica é ineficiente em imunodeprimidos e pacientes portadores do vírus HIV (ANDRADE et al., 2008). Há também a falta de biomarcadores robustos que auxiliem na avaliação da eficácia do tratamento (PINAZO et al., 2015).

Depois da introdução de nifurtimox e benzonidazol, dentre a extensiva lista das classes de compostos com atividade tripanossomicida, *in vitro* e *in vivo*, poucas substâncias foram submetidas a testes clínicos, sendo que, até 2002, apenas alopurinol, itraconazol e fluconazol haviam sido submetidos a tais testes. Isso é devido, em alguns casos, à ausência de forte indicação da cura efetiva, do potencial tóxico e/ou efeito teratogênico (geralmente testado somente *in vitro*) e a falta de interesse das companhias farmacêuticas nas suas sínteses (COURA e CASTRO, 2002; DIAS, et al., 2014).

Algumas substâncias estudadas foram as enzimas que inibem a síntese de esterol, tripanotona redutase, cisteína proteinase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerases, dihidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase (COURA e CASTRO, 2002; URBINA e DOCAMPO, 2003). Outras substâncias pesquisadas, e que haviam se mostrado bastante promissoras, são as que

utilizam antifúngicos baseados em azóis como posaconazol, que inibe esterol 14 α - desmetilase (CYP51) da via lipídica de ergosterol biossintética. Posaconazol demonstrou atividade significativa *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi*. Esta atividade varia de acordo com a cepa e é dependente da exposição à droga. Testes clínicos não demonstraram atividade tripanossomicida sustentável nos seres humanos; no entanto, seu perfil de segurança e dados de modelos experimentais sugere o uso potencial em combinação ou em terapias sequenciais (SURYADEVARA et al., 2013; FRANCISCO et al, 2015, MOLINA et al, 2015). Apesar dos estudos das moléculas acima mencionadas, é válido salientar que o número de alvos a serem explorados em iniciativas de descoberta de drogas contra a doença de Chagas ainda é limitado. Assim, os projetos de validação de alvo em estágio inicial de descoberta de medicamentos são interessantes (MERCALDI et al., 2014).

2.6. Prováveis proteínas de resistência do parasito

T. cruzi é um parasito intracelular aeróbio, por isso tem de evadir-se não somente das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas endogenamente pela via respiratória, como também tem que se defender daquelas produzidas pelo sistema imune do hospedeiro (TURRENS, 2004).

O mecanismo de resistência a fármacos tripanossomicidas permanece obscuro e pouco entendido (MURTA et al., 2006). Estudos relatam uma elevação no nível de expressão de algumas proteínas em cepas resistentes, quando tratadas com benzonidazol (MURTA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008).

Superóxido dismutase (SOD) consiste em um grupo de metaloenzimas antioxidantes que eliminam radicais superóxido ao convertê-los em oxigênio molecular; com isso, os radicais produzidos dentro das células são neutralizados, o que permite uma atividade celular normal e proteção de espécies reativas do oxigênio (EROs), demonstrando um importante papel para a sobrevivência e crescimento do parasito (MURTA et al., 2008; ANDRADE et al., 2008; MATEO et al., 2008). Em experimentos realizados com *Entamoeba histolytica*, resistentes ao metronidazol, o nível de expressão de SOD aumentou, quando o parasita foi submetido ao estresse provocado pela substância, indicando provavelmente uma proteção deste à ação tóxica do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (ANDRADE et al., 2008).

Em tratamentos de cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol foi demonstrado um aumento na expressão de SOD (TcFeSOD-A), quando os parasitos foram expostos ao

fármaco (NOGUEIRA et al., 2006). A presença de várias isoenzimas de SOD em diferentes localizações dentro da célula assegura uma ação mais efetiva contra eventuais aumentos de EROs intracelulares, mantendo um ambiente redutor favorável, o que poderia ser considerado um fator potencial de virulência, possuindo um papel importante na sobrevivência do patógeno dentro da célula hospedeira (MATEO et al., 2008).

A classificação de SOD distingue três formas de acordo com o metal co-fator presente: cobre-zinco SOD (Cu-Zn-SOD), manganês SOD (Mn-SOD) e ferro SOD (Fe-SOD), sendo que as duas primeiras ocorrem na maioria dos procariotos e eucariotos, inclusive em humanos. A terceira aparece em alguns procariotos, protozoários (por exemplo, em tripanosomatídeos) e cloroplastos de plantas e algas. Já foi descrito níquel SOD em *Streptomyces spp* (MATEO et al., 2008).

Peroxiredoxina (Prx) é um dos membros da família que leva o mesmo nome, proteínas antioxidantes, que se caracterizam por conter um domínio redutor conservado ativo de cisteínas. A função principal é a proteção contra os danos causados por peróxidos, levando à redução dos mesmos (ANDRADE et al., 2008). Em tripanosomatídeos, Prx ocorre no citosol ou na mitocôndria, podendo utilizar como substrato, diferentes espécies reativas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos e peroxinitritos (HARDER et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). Em *Leishmania donovani*, a peroxiredoxina mitocondrial (LdmPrx) protege da morte celular programada, atuando na detoxificação e prevenção contra os danos em proteínas, DNA e lipídeos causados por espécies reativas do oxigênio. Aparentemente, em mamíferos parece que a redução de Prx mitocondrial (PrxIII) pode ocasionar um acúmulo de peróxido de hidrogênio na mitocôndria, levando a um aumento de apoptose. Uma grande variedade de organismos apresenta Prx, sendo várias as funções, tais como detoxificação, sinalização ou diferenciação (HARDER et al., 2006).

Existem estudos demonstrando que há um aumento na expressão de Prx em *Entamoeba histolytica*, resistente ao metronidazol, e em células de mamíferos para proteger dos danos causados pelo peróxido de hidrogênio (HARDER et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). De acordo com Piacenza e colaboradores (2008), *T. cruzi* protege-se do ambiente oxidante por meio de peroxiredoxinas. Para estabelecer a infecção, tripomastigotas metacíclicos devem invadir macrófagos e sobreviver às condições altamente oxidativas dentro do fagossomo. Peroxiredoxinas apresentam um papel principal na minimização da formação de radicais derivados de peroxinitritos, como ânions de OH, NO₂ e CO₃ (PIACENZA et al., 2008).

Recentemente, o grupo de pesquisa da Profa. Regina Cicarelli clonou e sequenciou o gene de Prx de *T. cruzi* (cepa Y) (KOHATSU, 2013). A comparação entre as sequências de

Prx nos tripanosomatídeos e o alinhamento múltiplo de aminoácidos, a partir de dados do GenBank e do programa Target P, confirmou a presença da enzima no compartimento mitocondrial. A identidade entre Prx da cepa Y e CL Brener foi de 95%, pois existem pequenas diferenças entre os genomas das cepas. Em comparação com outros tripanosomatídeos, observou-se que *T. cruzi* apresenta maior identidade com *T. brucei* (71%) seguido de *Leishmania major* e *L. amazonensis* (68%), enquanto com *Crithidia fasciculata* foi de 43% (KOHATSU, 2013).

Old yellow enzyme (OYE) é uma NADPH oxidoreductase que apresenta flavina-nucleotídeo (FMN) como grupo prostético (MURTA et al., 2006; MURAKAMI, 2013). OYE tem sido identificada em leveduras, plantas e bactérias, porém, não em animais (KUBATA et al., 2002). Em *T. cruzi*, a enzima (TcOYE) cataliza a síntese de prostaglandina PGF2 α e reduz uma variedade de substâncias tripanossomicidas (PARODI-TALICE et al., 2004; MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008), como menadiona, β -lapachona, nifurtimox e 4-nitroquinolina-*N*-óxido (KUBATA et al., 2002; MURTA et al., 2006).

Cepas selecionadas *in vivo* e naturalmente resistentes aumentam o nível de expressão da enzima TcOYE, quando expostas ao benzonidazol. No entanto, algumas cepas de *T. cruzi* previamente induzidas *in vitro* para resistência ao benzonidazol diminuem o nível de expressão da OYE. Talvez, isso se deva ao fato de que PGF2 α esteja envolvida no metabolismo do benzonidazol e produza ânions de radicais tóxicos que conduzem o parasito à morte (MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). De acordo com Murta e colaboradores (2006), mais de uma cópia para o gene da enzima está presente no genoma de *T. cruzi*; entretanto, em cepas resistentes selecionadas *in vitro*, observou-se perdas, restando apenas uma cópia. Tal fato poderia influenciar a expressão da proteína, gerando uma menor produção de TcOYE, o que poderia ser considerado um mecanismo de escape devido a uma menor produção de PGF2 α , e consequentemente de radicais tóxicos (MURTA et al., 2006). 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 NAD(P)H flavina oxidoreductase têm sido relacionadas ao fenótipo resistente ao metronidazol em *Helicobacter pylori* (MURTA et al., 2006).

O mecanismo de resistência a fármacos utilizados contra *T. cruzi* ainda é pouco conhecido (NOGUEIRA et al., 2006; MURTA et al., 2006), embora alguns experimentos

tenham relatado que parasitas resistentes ao benzonidazol superexpressam algumas proteínas, quando expostos à substância (ANDRADE et al., 2008). Os parasitas apresentam alta heterogeneidade morfológica, genética, comportamental e de quadros clínicos, conferindo patogenicidade e parasitemia diferentes em cada cepa, o que dificulta o tratamento da enfermidade (DOST et al., 2002; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001).

2.7. Planejamento de novos fármacos

Na busca de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, muitas metodologias vêm sendo empregadas, sendo bastante utilizada a modificação molecular como estratégia no desenvolvimento de fármacos. O bioisosterismo, fenômeno observado entre duas substâncias estruturalmente relacionadas, que após passar por modificação de um átomo ou de um grupo de átomos, apresentam propriedades biológicas do fármaco original ou antagônico em um mesmo sítio receptor (BARREIRO e FRAGA, 2014; LIMA e BARREIRO, 2005). Bioisosterismo representa uma abordagem utilizada para a modificação racional dos compostos muitas vezes tóxicos, em agentes mais seguros e clinicamente eficazes. O conceito de bioisosterismo é muitas vezes considerado como qualitativo e intuitivo (PATANI e LA VOIE, 1996).

Um das grandes vantagens na utilização deste método como estratégia de desenvolvimento de novos agentes bioativos é poder melhorar o perfil farmacodinâmico de uma determinada substância, buscando assim transforma-la em um composto mais promissor que o protótipo, do ponto de vista biológico, ou seja, otimizando os efeitos terapêuticos e minimizando os efeitos adversos da substância. Sendo assim, o uso dessa ferramenta é de grande importância terapêutica e vêm sendo muito explorado na química medicinal (BARREIRO e FRAGA, 2014).

Partindo deste conceito, Bosquesi (2013) obteve uma série de derivados isósteros de nitrofurais, pela substituição do núcleo nitrofurânico por núcleo furoxânicos dentre eles o benzofuroxano. Estes compostos foram sintetizados, caracterizados e identificados, sendo avaliados quanto à atividade tripanossomicida *in vitro* em formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

2.7.1. Benzofuroxânico

A ampla diversidade de atividade biológica de compostos contendo os núcleos furoxânicos e benzofuroxânicos (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol) (figura 11) é conhecida há décadas (SCHIEFER et al., 2012). Compostos contendo o núcleo benzofuroxânico têm atraído cada vez mais a atenção da Química Farmacêutica e Medicinal devido ao fato de possuírem propriedades antimicrobiana, antiparasitária e antivírus da imunodeficiência humana (HIV) (CERECETTO, 2005; RANI e GRANCHI, 2014).

Figura 11: Estrutura química do núcleo benzofuroxânico (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol)



Fonte: Cerecetto et al, 1999

Estudos realizados por Castro e colaboradores (2009) demonstraram que alguns derivados benzofurânicos por ele estudados eram capazes de produzir espécies reativas de oxigênio em *T. cruzi*. Além da atividade tripanossomicida, tais compostos também apresentaram atividade leishmanicida, o que segundo o autor, pode ser resultado da interferência na função mitocondrial do parasita e na produção de espécies reativas de oxigênio.

A geração desses radicais contribui para a desestabilização da membrana celular do parasita, pois quanto maior a quantidade de radical livre gerado, maior será o dano causado pelo estresse oxidativo no *T. cruzi* (PAULA, 2009; BOIANI et. al, 2006).

Segundo Boiani e colaboradores (2006), os compostos derivados benzofuroxânicos (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol) foram descritos pela primeira vez como agentes tripanossomicidas por apresentarem atividade *in vitro* similar ao fármaco de referência, benzonidazol.

3. JUSTIFICATIVA

Por ser um parasito intracelular aeróbio, *T. cruzi* precisa reduzir não somente as espécies reativas de oxigênio produzidas endogenamente pela via respiratória, como também defender-se daquelas produzidas pelo sistema imune do hospedeiro (MÜLLER et al., 2003).

Dado que compostos com anéis benzofuroxânicos estão relacionados com a produção de espécies reativas de oxigênio (CERECETTO e PORCAL, 2005), também poderiam estar envolvidos no metabolismo oxidativo que envolve as enzimas cTcOYE e mTcTXNPx.

Por isso, a importância de maiores esclarecimentos sobre essas enzimas e a busca por novas moléculas mais ativas, menos tóxicas para o hospedeiro e mais específicas contra *T. cruzi*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade tripanossomicida na cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratada com o derivado benzofuroxânico (6-((metil)benzo[c](2-carbamoilidrazona)-1-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) pelo teste colorimétrico do MTT para o cálculo do IC₅₀ e avaliar a expressão das proteínas Prx, SOD e OYE provenientes dos extratos totais da cepa Y de *T. cruzi* tratadas e não tratadas com o referido derivado.

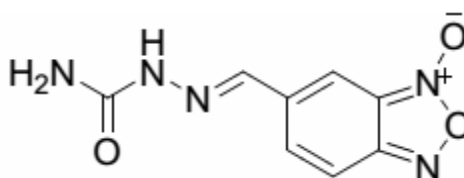
4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Avaliação da suscetibilidade ao derivado benzofuroxânico LAPDESF-BZFS nas formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*;
- 4.2.2. Obtenção de extratos totais de *T. cruzi* após tratamento com o composto derivado benzofuroxânico LAPDESF-BZFS;
- 4.2.3. 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 o composto derivado benzofuroxânico LAPDESF-BZFS.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, foi utilizado o composto (6-((metil)benzo[c](2-carbamoilidrazona)-1-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) sintetizado, caracterizado e identificado por Bosquesi (2013) (figura 12), e que nos foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dra. Chung Man Chin do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Figura 12: Composto 6-((metil)benzo[c](2-carbamoilidrazona)-1-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol



Fonte: Bosquesi (2013)

5.1. Meio de cultura, soluções e géis

- 5.1.1. 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*; 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 e 1% de 2,5 mg/mL *haemin* , previamente dissolvido em 50 mM NaOH e filtrado com membrana de 0,22 µm.
- 5.1.2. Corante *Coomassie brilliant blue* R-250: 0,1% *Coomassie brilliant blue*; 40% etanol; 10% de acético glacial.
- 5.1.3. Descorante: 40% etanol; 10% ácido acético glacial.
- 5.1.4. MTT e PMS: 2,5 mg/mL MTT (Sigma); 0,22 mg/mL PMS (Sigma).
- 5.1.5. 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.

- 5.1.6. 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.
- 5.1.7. 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.
- 5.1.8. 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.
- 5.1.9. Tampão de transferência: 48 mM Tris; 39 mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol.
- 5.1.10. 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.
- 5.1.11. Tampão PBS: 130 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄.
- 5.1.12. Tampão TBS: 50 mM Tris; 150 mM NaCl.
- 5.1.13. Tampão tris glicina: 25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,01% SDS 10%.
- 5.1.14. Tampão *tris wash*: 100 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5.
- 5.1.15. Tampão de lavagem: M NaH₂PO₄ pH 8,0; 300mM NaCl; 20mM imidazol; 6 M ureia

5.2. Cultivo de parasitas

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953) foram cultivadas em meio LIT – *Liver Infusion Tryptose* (FERNANDES e CASTELLANI, 1966). O cultivo dos parasitos foi mantido em câmara BOD (FANEM) a 28°C, o repique realizado a cada 15 dias para manutenção e a cada 7 dias para testes de indução com o composto derivado de benzofuroxânico LAPDESF-BZFS.

5.3. Ensaio citotóxico de MTT

A técnica colorimétrica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi desenvolvida por Mosmann em 1983, neste trabalho utilizou – se o método conforme descrito por Cotinguiba et al. (2009).

Após observação de ausência de contaminação na cultura de *T. cruzi*, os parasitas foram tratados como descrito a seguir, para contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico comum.

Em um tubo de 1,5 mL, adicionou-se:

0,5 µL de formol

19 µL de meio de cultura

1 µL de parasita (diluição 1:20)

Obs.: o formol tem a finalidade de imobilizar os parasitos para facilitar sua contagem.

O cálculo da concentração de parasitas faz-se como segue:

Número total de parasitas/mL = n. parasitas contados/ 2 (n. quadrantes) X diluição (20) X 10^4 .

A suspensão dos parasitas foi então ajustada para 1×10^7 parasitas/ mL.

Para diluição das substâncias a serem testadas em DMSO (dimetilsulfóxido - VETEC), utilizou-se o seguinte cálculo para a solução estoque:

→ para cada 0,5 mg de substância pura, 25µL de DMSO: concentração final de 20mg/ml. A dissolução foi realizada com auxílio de um vórtex. A partir da solução estoque foram realizadas as diluições a serem testadas em uma microplaca de 96 poços:

Iniciou-se com uma diluição de 5 mg/ml, colocada no poço H: 10 µL 20mg/ml (estoque) + 30 µL DMSO. Assim, as concentrações finais de substância nos respectivos poços foram as seguintes:

		Substância 5 mg/mL	DMSO
A	100 µg/ml	16 µL	8 µL
B	50 µg/ml	8 µL	16 µL
C	25 µg/ml	4 µL	20 µL
D	10 µg/ml	2 µL	28 µL
E	5 µg/ml	1 µL	29 µL
F	2,5 µg/ml	1 µL	59 µL
G	1 µg/ml	1 µL	149 µL

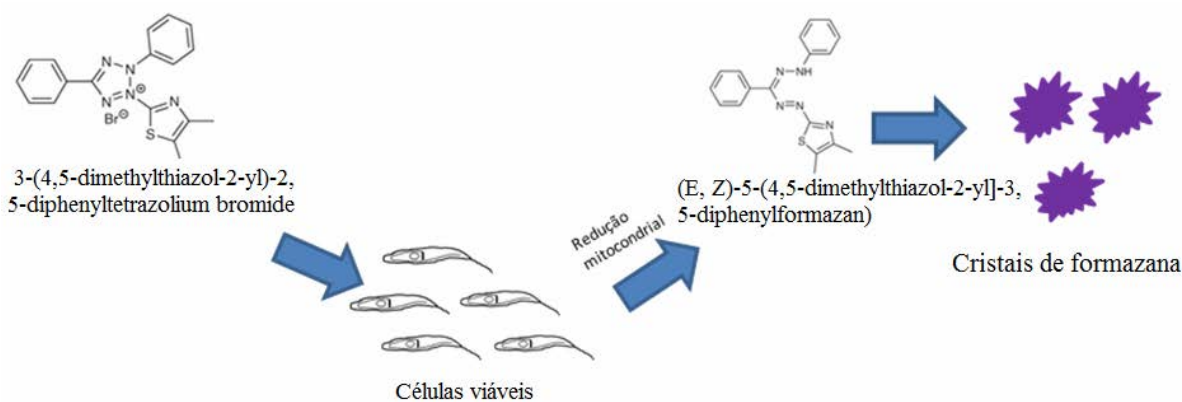
Cada uma das concentrações (3 µL) foram adicionadas em poços numa nova placa em triplicatas (fileiras A a G, colunas 1 a 6). Em seguida, adicionou-se 97 µL de meio de cultura contendo parasitas nas colunas 1, 2 e 3 e apenas meio de cultura nas colunas 4, 5 e 6 (controle). A fileira H serve como controle: colunas 1 a 3, contendo somente parasitas, sem substancia; e 4 a 6, somente meio de cultura, sem substancia.

A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 72 horas. Adicionou-se 10 µL de solução MTT + PMS por orifício (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS), repetindo-se a incubação por mais 1h15min ao abrigo da luz, seguido da adição de 100 µL de solução SDS 10% / HCl 0,01M para dissolver os cristais de formazan; incubou-se por mais 30 min.

A leitura da Densidade Óptica (DO) foi realizada em leitor de Elisa (Bio Rad) a 595 nm. Com as absorbâncias obtidas foram elaborados cálculos e gráficos utilizando o programa Origin 7.0 (WASS, 2002) para determinação do IC₅₀ (concentração que mata 50% dos parasitas) de acordo com Cotinguiba et al. (2009).

O sal MTT, figura 13, é reduzido a formazana (formação um precipitado roxo) pela ação da succinato desidrogenase presente na mitocôndria de célula viável; assim, após a incubação quanto mais escura estiver a solução, maior a viabilidade celular ou a atividade metabólica da célula (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

Figura 13: Fundamento do teste colorimétrico do MTT



Fonte: Autor

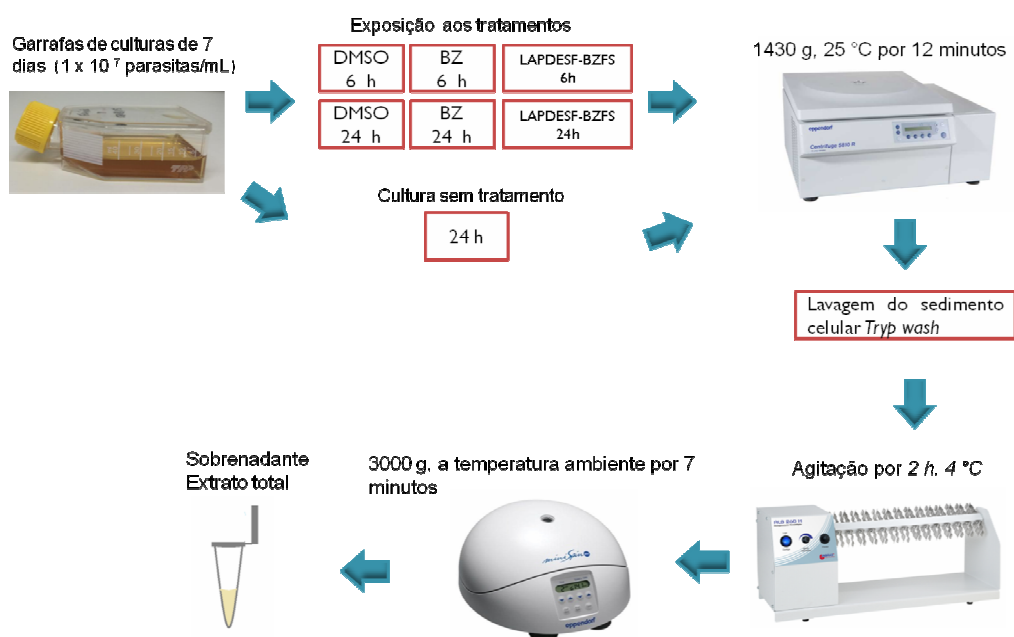
5.4. Obtenção de extrato total de proteínas dos parasitas

A obtenção de extrato total de proteínas dos parasitas foi realizada de acordo com o protocolo de Parodi-Talice e colaboradores (2004). O teste foi realizado em garrafas de culturas de 60 mL, contendo 30 mL de cultura a uma concentração de 1×10^7 parasitos/mL, sendo: uma garrafa contendo parasitas sem tratamento - controle (24 horas de incubação); duas garrafas (6 e 24 horas) com parasitas expostos ao composto a na concentração do IC₅₀

(6,88 $\mu\text{g/mL}$); duas garrafas (6 e 24 horas) com culturas expostas a DMSO (dimetil sulfóxido); e duas garrafas (6 e 24 horas) contendo benzonidazol na concentração do IC_{50} (9,01 $\mu\text{g/mL}$). Após esse período, todas as culturas foram centrifugadas à 1.430 g, 25 °C, por 12 minutos. O pellet obtido foi lavado com tampão *Tryps Wash* (100 mM NaCl; 3 mM MgCl_2 ; 20 mM Tris-HCl pH 7,5), seguido de lise com inibidores de protease (Pepstatina 2 $\mu\text{g/mL}$; Aprotinina 10 $\mu\text{g/mL}$ e Leupeptina 10 $\mu\text{g/mL}$), por duas horas a 4 °C e rotação constante no homogeneizador. O lisado foi submetido a uma nova centrifugação à 3.000 g, a temperatura ambiente por 7 minutos, onde foi recolhido o sobrenadante.

Após a lise, a quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford com leitura realizada a 595 nm utilizando SAB (soro albumina bovina) como padrão. Os sobrenadantes contendo as proteínas solúveis foram armazenados a - 80°C até o momento do uso.

Figura 14: Obtenção dos extratos totais de *T. cruzi* tratados e não tratados.



Fonte: Autor

5.5. Western Blotting

Após a obtenção dos extratos totais de *T. cruzi*, os níveis de expressão de enzimas foram avaliados de acordo com o descrito em Kohatsu (2013).

O protocolo consistiu resumidamente no seguinte: após lise, os extratos foram quantificados e as concentrações determinadas para cada enzima foram ressuspensas em 5 μL de tampão de amostra (Tris-HCl 1M pH 6,8; SDS 10%; azul de bromofenol 1%; Glicerol 10% e água Milli-Q) contendo DTT 250 mM, e fervidos a 98 °C por 10 minutos. As proteínas

foram separadas em gel SDS-PAGE 10% à 150 V, 4 °C, por aproximadamente 2 horas. Em seguida, foram transferidas para membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno; GE Healthcare). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução 5% de leite desnatado, por 1 hora à temperatura ambiente, seguindo-se a incubação com os respectivos anticorpos primários a 4 °C por 18 horas. No dia seguinte foram feitas lavagens, três vezes por 5 min cada, com tampão PBS (130 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄) contendo 0,1 % Tween-20. Adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase e diluições: (1:400, 1:500 e 1:600). Repetiu-se as três lavagens com tampão PBS contendo 0,1 % Tween-20. A revelação foi realizada com 2,5 mM luminol e 6 µL de peróxido de hidrogênio à 30%.

6. RESULTADOS e DISCUSSÃO

6.1. Screening de extratos naturais e substâncias puras com potencial tripanossomicida

Muitos pesquisadores têm buscado na natureza substâncias que possuam ação tripanossomicida, e assim tentar obter um novo fármaco com reações adversas menos agressivas. Pensando nisso, o grupo de pesquisa da orientadora, desde 2008, mantém parcerias com outros pesquisadores, testando substâncias puras, extratos vegetais e óleos essenciais. Desde então, mais de 1000 amostras foram testadas, dentre as quais mais de 80 amostras apresentaram um $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$. Quando comparados com o IC_{50} do BZ que é de $9,04 \mu\text{g/mL}$, observamos que tais amostras podem ser futuras candidatas a fármacos (VELÁSQUEZ, et al., 2014), pois utilizando se de ferramentas como o bioisosterismo, seria possível modificações a fim de reduzir possíveis efeitos adversos que essas amostras possam vir a apresentar. Entre essas substâncias está a que foi utilizada neste trabalho. Nas tabelas abaixo, estão apresentadas algumas das amostras testadas com seus respectivos IC_{50} .

Tabela 1: Extratos brutos obtidos de plantas e fungos

Material Bôtanico: Oxalidaceae (*Oxalis* sp.)

Código da amostra	Parte utilizada	IC_{50}
R 81	Folhas	110,5
R 82	Galhos	>500

Material Bôtanico: Piperaceae (*Piper* sp.)

Código da amostra	Parte utilizada	IC_{50}
R 223	Galhos	>500
R 226	Folhas	293,6
R 227	Folhas	322,3

Material Bôtanico: Euphorbiaceae (*Alchonea Sidifolia*)

Código da amostra	Parte utilizada	IC_{50}
HEX	Folhas	>500
ETOH	Folhas	435,7
HEX	Folhas	225,8
AcOEt.	Folhas	>500
N-BrOH	Folhas	>500
HA	Folhas	>500
HEX	Ramos	381,9
ETOH	Ramos	>500
AcOEt	Ramos	435,7

N-BrOH	Ramos	>500
HA	Ramos	>500

Material Bôtanico: Clusiaceae (*Garcinia brasiliensis*)

Código da amostra	Parte utilizada	IC ₅₀
Gabr-Hex	Ramos	164,3
Gabr-Ethanol	Ramos	232,1
Gabr-Ethanol	Folhas	289,9
Gabr-Hex	Folhas	104,0

Material Bôtanico: Euphorbiaceae (*Garcinia xanthochymus*)

Código da amostra	IC ₅₀
ETOH	>500
HEX	ND*

Material Bôtanico: Rubiaceae (*Alibertia macrophylla*)

Código da amostra	IC ₅₀
Extrato bruto	>500
Partição ACN	ND
Fração 4	ND

Material Bôtanico: Myrtaceae (*Eugenia jambolana*)

Código da amostra	IC ₅₀
HACC18 4A	>500

Material Botânico: Euphorbiaceae (*Alchornea glandulosa*)

Fungo endofítico: *Schizophyllum commune*

Código da amostra	IC ₅₀
PDB peq. Escala	>500
Nutriente	248,7
Malte	>500
Ym	418,7
CZAPECK	>500
Milho	45,7
Arroz	41,01
PDB larga escala	>500

Material Botânico: *Senna spectabilis*

Fungo endofítico: *Colletotrichum sp.*

Código da amostra	IC ₅₀
Cs- c (16) - PDB Le	>500
Cs- c (16) - PDB	>500
Cs- c (16) - Malte	>500
Cs- c (16) - Czapek	>500
Cs- c (16) - YM	>500

Material Bôtanico: Bignoniaceae

Código da amostra	Nome da espécie	Parte utilizada	IC ₅₀
AM 207	<i>Anemopaegma glaucum</i>	Folhas	385,2

Am 208	<i>Anemopaegma glaucum</i>	Galhos	>500
Am 209	<i>Anemopaegma glaucum</i>	Raízes	>500
Am 169	<i>Memora axillaris</i>	Folhas	461,2
Am 170	<i>Memora axillaris</i>	Galhos	>500
Am 190	<i>Arrabidaea florida</i>	Folhas	119,5
Am 204	<i>Arrabidaea brachypoda</i>	Folhas	45,7
M 662	<i>Arrabidaea samydoides</i>	Folhas	39,4
M 844	<i>Tabebuia serratifolia</i>	Folhas	>500
M 987	<i>Arrabidaea subfastigiata</i>	Folhas	76,9
M 988	<i>Arrabidaea subfastigiata</i>	Galhos	>500
M 1008	<i>Distictella mansoana</i>	Folhas	<25
M 1009	<i>Distictella mansoana</i>	Galhos	310,7
M 1010	<i>Distictella mansoana</i>	Frutos	473,5
M 1041	<i>Jacaranda brachypoda</i>	Folhas	37,4
M1042	<i>Jacaranda brachypoda</i>	Galhos	94,7
M 1205	<i>Tabebuia cassinoides</i>	Folhas	333,9
M 1206	<i>Tabebuia cassinoides</i>	Galhos	>500
M 1212	<i>Jacaranda puberula</i>	Folhas	>500
M 1213	<i>Jacaranda puberula</i>	Galhos	>500
R 128	<i>Zeyheria tuberculosa</i>	Folhas	325,8
R 129	<i>Zeyheria tuberculosa</i>	Galhos	>500
R 130	<i>Jacaranda micrantha</i>	Folhas	>500
R 131	<i>Jacaranda micrantha</i>	Galhos	>500
R 186	<i>Arrabidaea pulchra</i>	Folhas	142,9
R 187	<i>Arrabidaea pulchra</i>	Galhos	>500
R 194	<i>Anemopaegma chamberlaynii</i>	Folhas	>500
R 195	<i>Anemopaegma chamberlaynii</i>	Galhos	>500
R 201	<i>Stizophyllum perforatum</i>	Folhas	<25
R 202	<i>Stizophyllum perforatum</i>	Galhos	170,2
Rm 26	<i>Jacaranda puberula</i>	Folhas	54,9
Rm 27	<i>Jacaranda puberula</i>	Galhos	>500

DERIVADOS DO ÁCIDO FERÚLICO	
Código da amostra	IC₅₀
Ácido Ferúlico	>100
AAF	>100
Ferulato de Metila	>100
Ferulato de etila	>100
Ferulato de Isopropila	25
Ferulato de Propila	23,8
Ferulato de Butila	34,7
Ferulato de Pentila	18,7
Ferulato de Hexila	21,5
Ferulato de Heptila	5,3

Derivados benzofuroxânico

Código da amostra	IC₅₀
--------------------------	------------------------

LAPDESF-BZTS	6,67
LAPDESF- BZFS	6,88

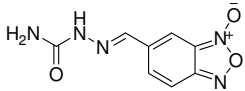
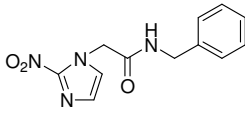
Legenda: ND: não foi possível determinar o IC₅₀.

Para os extratos, o teste foi realizado com uma concentração maior de amostras do que a que foi utilizada para substância pura, por isso os seus valores de IC₅₀ é mais elevado.

6.2. Teste colorimétrico do MTT

No teste colorimétrico do MTT observado na tabela 2, o composto LAPDESF-BZFS apresentou uma atividade tripanossomicida, menor que a apresentada pelo fármaco de escolha, BZ.

Tabela 2: Avaliação da suscetibilidade da cepa de *T. cruzi*, formas epimastigotas, ao derivado benzofuroxânico

Composto	IC ₅₀ formas epimastigotas μg/mL; (μM)
 LAPDESF-BZFS	6,88; (31,1)
 (BZ)	9,01; (34,6)

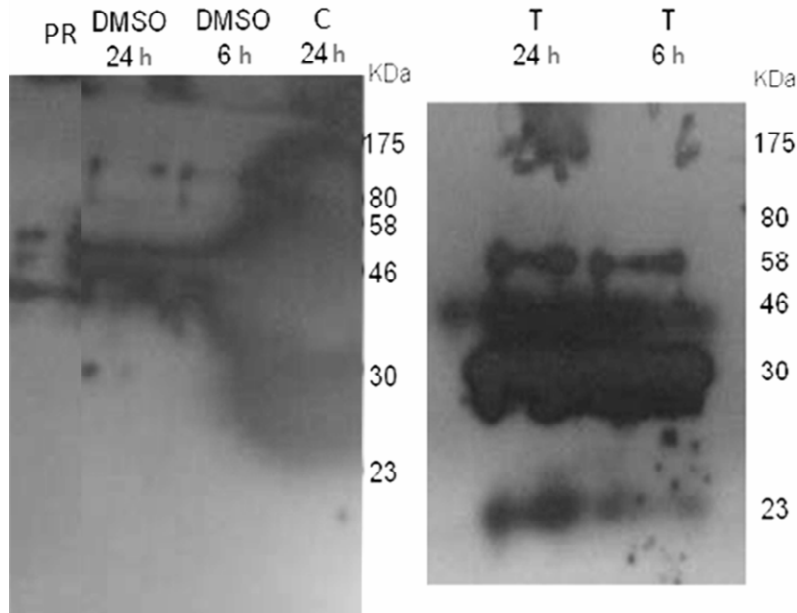
Bosquesi, (2013) realizou por ensaio de micronúcleo, testes de mutagenicidade para este composto e os resultados estatísticos obtidos, quando comparados com o controle positivo demonstraram que o composto LAPDESF-BZFS não é mutagênico. Esses resultados somados com a alta atividade tripanossomicida desse composto, demonstra uma vantagem do LAPDESF-BZFS podendo se tornar uma futuro fármaco no tratamento a doença de Chagas.

6.3. Western blotting

Em um primeiro ensaio, as enzimas OYE (diluição 1:600) e SOD (diluição 1:600) mostraram superexpressão, o que dificultou a identificação da bandas no blot, conforme apresentado na figura 15 para o ensaio com cTcYOE. Por essa razão, as concentrações foram alteradas tanto para o extrato quanto para o anticorpo primário, para que fosse então possível visualizar as bandas.

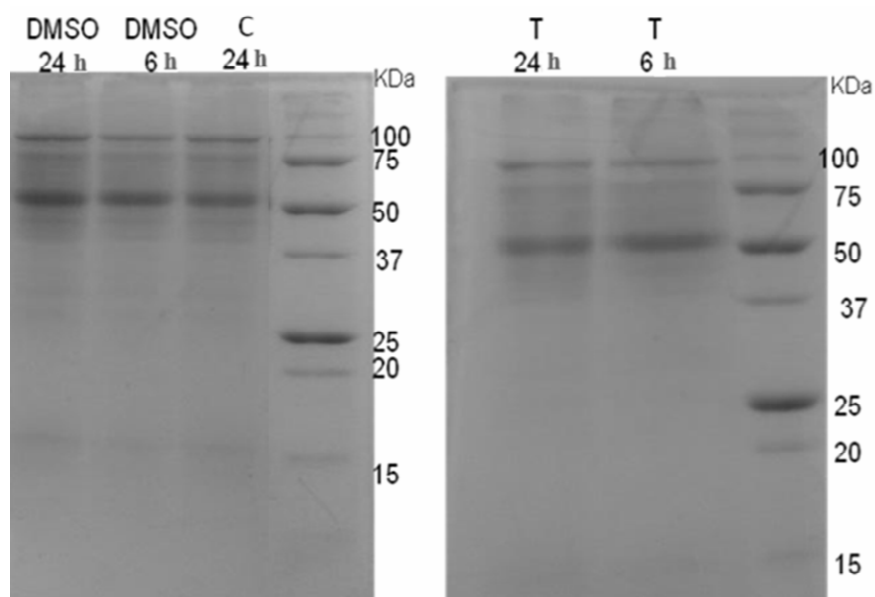
Para garantir que não houvesse interferências na expressão das proteínas devido a problemas na quantidade de amostra aplicada, os géis SDS-PAGE 10% (figuras 16, 18 e 20) foram realizados ao mesmo tempo que os géis para transferência e *Western blotting*. A concentração da proteína recombinante utilizada (0,01 µg/mL), não pode ser detectada no gel devida sua baixa sensibilidade. Assim, por questão de economia desse reagente optou-se por não aplicá-la nos ensaios de gel SDS – PAGE.

Figura 15: *Western blotting* do extrato total (10 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com o derivado benzofuroxânico e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:600). PR = cTcOYE recombinante, C= cultura sem tratamento e T= tratados 6 e 24 horas.



Fonte: Autor

Figura 16: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado com 0,1% Coomassie-Blue realizado para Old Yellow Enzyme com a concentração de 10 µg/poço de extratos. C= cultura sem tratamento, T= Tratados 6 e 24 horas

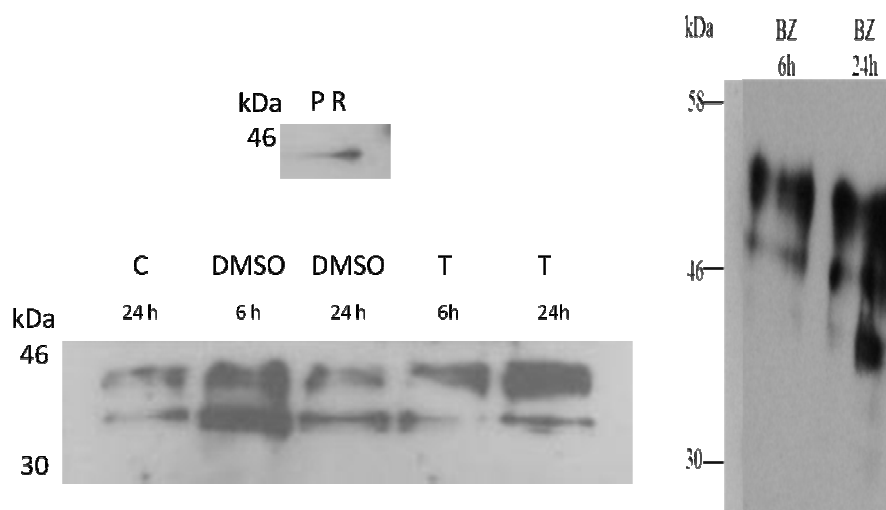


Fonte: Autor

Também, verificou-se que a concentração de 3 µg de proteína (OYE) por poço do gel, previamente padronizada por Kohatsu (2013), não foi suficiente para visualização das bandas nestes experimentos. Assim, a concentração de 5 µg de proteína foi testada, mostrando-se mais adequada. A diluição de anticorpo 1:500 foi a que apresentou melhor resultado, conforme apresentado na figura 17.

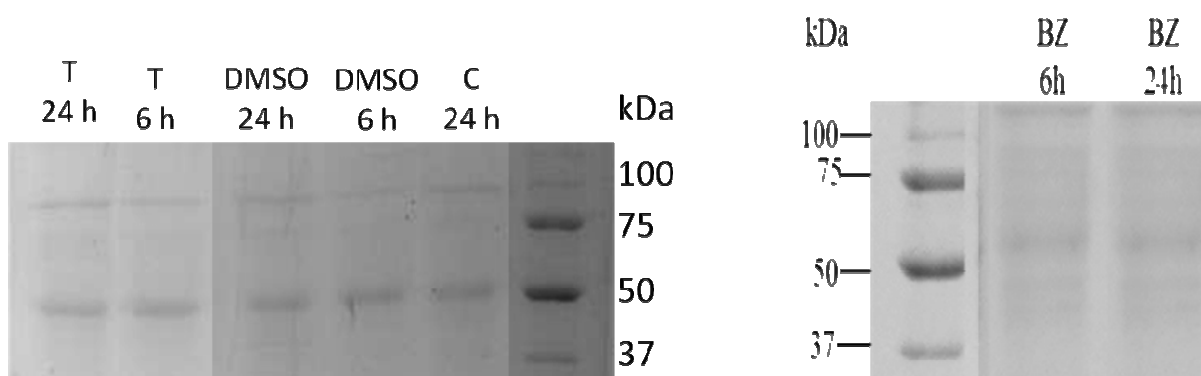
Cepas selecionadas *in vivo* e naturalmente resistentes aumentam o nível de expressão da enzima TcOYE, quando expostas ao benzonidazol (MURTA et al., 2006). Entretanto, cepas previamente induzidas à resistência ao BZ diminuem a expressão desta enzima que, segundo Murta e colaboradores (2006) poderia ser um mecanismo de escape do parasita, uma vez que a expressão de OYE está envolvida com a síntese de PGF2α, que durante a metabolização de fármacos tripanossomicidas produz radicais tóxicos que levam à morte do parasita, o que justificaria a diminuição na expressão. Em tratamento com o novo composto, o parasita aumentou a expressão desta enzima sendo necessária uma diluição do extrato proteico para melhor definição e visualização da banda no blot.

Figura 17: *Western blotting* do extrato total (5 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com o derivado benzofuroxânico e revelado com anticorpo anti cTcOYE (1:500). PR = cTcOYE recombinante, C= cultura sem tratamento, T= tratados 6 e 24 horas e BZ= benzonidazol



Fonte: Autor

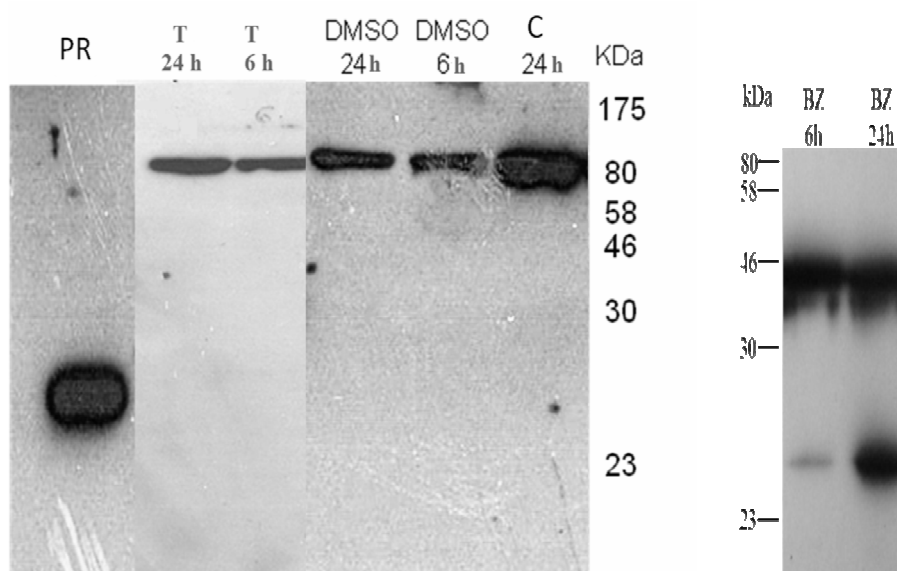
Figura 18: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado com 0,1% *Coomassie-Blue* realizado para *Old Yellow Enzyme* com a concentração de 5 µg/poço de extratos. C= cultura sem tratamento, T= Tratados 6 e 24 horas e BZ= benzonidazol 6 e 24 horas



Fonte: Autor

Para a proteína Prx (figura 19), utilizou-se nos experimentos a proteína recombinante mTcTXNPx de 25,5 kDa para indicar a localização da banda esperada no extrato total. Alguns autores (NOGUEIRA et al., 2009) tem relatado a possível formação de dímeros dessas proteínas, porém, nenhum estudo foi realizado até o momento que possa comprovar essa hipótese. Assim, a banda de 80 kDa, pode refletir essa dimerização.

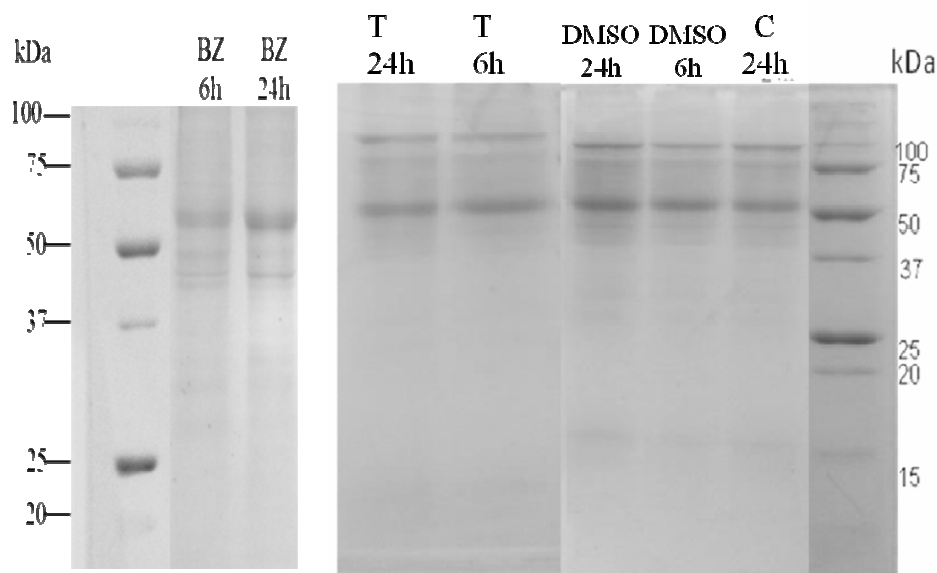
Figura 19: Western blotting do extrato total (10 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi* tratada com o derivado benzofuroxânico e revelado com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400). PR = mTcTXNPx recombinante, C= cultura sem tratamento, T= tratados 6 e 24 horas e BZ= benzonidazol



Fonte: Autor

Nogueira (2009) demonstrou que o aumento na expressão mTcTXNPx de *T. cruzi* ocorreu apenas na cepa *in vitro* induzida. Dados na literatura indicam que a proteína cTcTXNPx nativa apresenta polipeptídeo de 23 kDa e 46 kDa. Enquanto que mTcTXNPx nativa possui 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 (50 kDa) (PIÑEYRO et al., 2005).

Figura 20: Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 10% corado com 0,1% *Coomassie-Blue* realizado para mTcTXNPx com a concentração de 10 µg/poço de extratos. C= cultura sem tratamento, T= Tratados 6 e 24 horas e BZ= benznidazol 6 e 24 horas.



Fonte: Autor

Para a proteína SOD, foi realizado testes com 3 µg/mL de extrato proteico (dados não mostrados). Porém ocorreu uma superexpressão, inviabilizando a visualização das bandas no *Western Blotting*.

7. CONCLUSÕES

O IC₅₀ apresentado no teste de MTT mostrou que o composto em estudo tem potência tripanossomicida (IC₅₀: 6,88 µg/mL) superior ao benzonidazol que apresentou IC₅₀ de 9,01 µg/mL;

Os níveis elevados de expressão de OYE parecem confirmar dados da literatura de seu envolvimento com a defesa do parasita, sendo necessário usar concentração menor do que 10 µg/ml de extrato proteico no ensaio de *Western Blotting* para visualizar melhor as bandas. Entretanto, a superexpressão pode aumentar a produção de PGF2α que metabolizaria o composto levando à formação de radicais tóxicos induzindo a morte dos parasitas;

Os resultados da expressão de Prx mostram a presença de uma banda de outras bandas acima de 25 kDa, corroborando com a hipótese de que essa enzima apresenta isoformas;

Os anticorpos policlonais anti cTcOYE e mTcTXNPx, reagiram com as proteínas nativas específicas, presentes no extrato total, com pesos moleculares próximo a 46 e 58 kDa para cTcOYE e 25, 46 e 80 kDa para mTcTXNPx;

A superexpressão apresentada pela SOD dificultou a análise por *Western Blotting* o que parece sugerir que este não seja o método mais adequado para avaliar a expressão dessa enzima.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

APHASIZHEVA, I.; MASLOV, D. A.; APHASIZHEV, R. Kinetoplast DNA-encoded ribosomal protein S12. **RNA Biology**. v. 10, p. 1679-1688, 2013.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, p. 121-164, 2001.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 347-406, 2014.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**. v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BARTHOLOMEU, D. C.; PAIVA, R. M. C.; MENDES, T. A. O.; DaROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. R. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. **PLoS Pathogens**. v.10, 2014.

BOIANI, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; ORTIZ, S. T.; SERNA, E.; BILBAO, N. V.; SANABRIA, L.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R.; VEJA, C.; ROLAN, M.; GÓMEZ-BARRIO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 49, p. 3215-3224, 2006.

BOSQUESI, P.L., **Planejamento, síntese e avaliação biológica de Derivados furoxânicos e benzofuroxânicos potencialmente antichagásicos**, 2013. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – FCFar, Araraquara, 2013.

CARNEIRO, J. N. P.; ALBUQUERQUE, R. S. LEITE, N. F.; MACHADO, A. J. F.; BRITO, D. I. V. ROLÓN, M.; VEGA, C.; CORONEL, C.; COUTINHO, H. D. M.; MARIS-BRAGA,

M. F. B. Avaliação da atividade tripanonocida, leishmanicida e citotóxico do geraniol e citronelal. **Caderno Cultura e Ciência**. v.13, 2015.

CASTRO, D.; BOIANI, L.; BENITEZ, D.; HERNÁNDEZ, P.; MERLINO, A.; GIL, C.; OLEA-AZAR, C.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; PORCAL, W. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: Synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 5055-5065, 2009.

CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure-Activity Relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 42, p. 1941-1950, 1999.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 5, p. 57-71, 2005.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, 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. Special issue on Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110 (2), p. 275-276, 2015^a.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110 (3), p. 277-282, 2015^b.

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

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106 (6), p. 641-645, 2011.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.45(3), p.286-296, 2012.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge, **Nature (London)**. v. suplem, p. s6-s7, 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V., Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries, **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 109(7), p. 856–862, 2014.

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, cap. 7, p. 90-94, 2000.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. S. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47 (1), p. 123-125, 2014.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas disease (american trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 103-121, 1999.

DOST, C. K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO, J. C. Jr. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitology Research**. v. 88, p. 609-616, 2002.

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.

FRANCISCO, A. F.; LEWIS, M. D.; JAYAWARDHANA, S.; TAYLOR, M. C.; CHATELAIN, E.; KELLY, J. M. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive *In Vivo* Imaging. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 59, p. 4653-4661, 2015.

FRANCO-PAREDE, C.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. The Unfinished Public Health Agenda of Chagas Disease in the Era of Globalization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.3, e450, 2009.

GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf> acesso em : 10.12.2015.

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.

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.

HOWARD, E. J.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; SOSA – ESTAND, S.; BUEKENS, P.; Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**. v. 121: p. 22–33, 2014.

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

KOHATSU, A. A. N. **Avaliação das estruturas químicas derivadas de diaminas do ferroceno no metabolismo oxidativo em cepas de *Trypanosoma cruzi***. 88 f. 2013.

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.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 23-49, 2005.

LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**. v. 27, p. 837-843, 2010.

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.

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.

MAYA JD, CASSELS, BK, ITURRIAGA-VASQUEZ P, FERREIRAJ, 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 (Review) **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** v.146, p. 601-620, 2006.

MERCALDI, G. F.; RANZANI, A. T.; CORDEIRO, A. T.; Discovery of New Uncompetitive Inhibitors of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 19, p. 1362-1371, 2014.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SANCHES-MONTALVÁ, A. The use of posaconazole against Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v.28, p.397- 407, 2015.

MORELO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry Physiology Pharmacology Toxicology Endocrinology**. v. 107, n. 3,p. 367-371, 1994.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. v. 86, p. 999–1002, 2000.

MURAKAMI, M. T.; RODRIGUES, N. C.; GAVA, L. M.; HONORATO, R. V.; CANDURI, F.; BARBOSA, L. R. S.; OLIVA, G.; BORGES, J. C. Structural studies of the *Trypanosoma cruzi* Old Yellow Enzyme: Insights into enzyme dynamics and specificity, **Biophysical Chemistry**. v. 184, p. 44-53, 2013.

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 benznidazole 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.

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 benznidazole. **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 trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitology Research**. v. 104, p. 835-844, 2009.

OROZCO, M. M.; ENRIQUEZ, G. F.; ALVARADO-OTEGUI, J. A.; CARDINAL, M. V.; SCHIJMAN, A. G.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. New Sylvatic Hosts of *Trypanosoma cruzi* and Their Reservoir Competence in the Humid Chaco of Argentina: A Longitudinal Study. **The American Journal of Tropical medicine and Hygiene**. v. 88, p. 872-882, 2013.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química nova**. v. 32, p. 1013-1020, 2009.

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.

PATANI, G. A.; LA VOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**. v. 96, p. 3147-3176, 1996.

PEREIRA, P. C. M., NAZARRO, E. C., Challenges and perspectives of Chagas disease: a review, **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 19, p. 34, 2013.

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, n. 2, p. 359-368, 2008.

PINAZO, M. C.; THOMAS, M. C.; BUSTAMANTE, J.; DE ALMEIDA, I. C.; LOPEZ, M. C.; GASCON, J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 422-432, 2015.

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.

RAJÃO, M. A.; FURTADO, C., ALVES, C. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; MOURA, M. B.; SCHAMBER-REIS, B. L.; KUNRATH-LIMA, M.; ZUMA, A. A; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; GARCIA, J. B. F.; MENDES, I. C; PENA,S. D. J.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; SOUZA-PINTO, N. C.; MEDEIROS, M. H. G.; CRUZ, A. K.; MOTTA, M. C. M.; TEIXEIRA, S. M. R.; MACHADO, C. R. Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.55 (4), p. 309-321, 2014.

RANI, R.; GRANCHI, C. Bioactive heterocycles containing endocyclic *N*-hydroxy groups. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 97, p. 505-524, 2014.

SCHIEFER, I.T.; VANDEVREDE, L.; FA', M.; ARANCIO, O.; THATCHER, G.R. Furoxans (1,2,5-oxadiazole-*N*-oxides) as novel NO mimetic neuroprotective and procognitive agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 55, p. 3076-87, 2012.

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

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.110, p. 289-298, 2015.

SURYADEVARA, P. K.; RACHERLA, K. K.; OLEPU, S.; NORCROSS, N. R.; TATIPAKA, H. B. Dialkylimidazole inhibitors of *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase as anti-Chagas disease agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, p. 6492-6499, 2013.

TEIXEIRA A. R. L.; NITZ N.; GUIMARO M. C.; GOMES C.; SANTOS-BUCH C. A. Chagas disease. Postgrad. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 82, p. 788-798, 2006.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHINOL, M.; CREPALDI, P. H. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease, **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 6(8), e. 1749, 2012.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 25, p.211-220, 2004.

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

VELÁSQUEZ, A. M. A.; FRANCISCO, A. I.; KOHAITSU, A. A. N.; SILVA, F. A. J.; RODRIGUES, D. F.; TEIXEIRA, R. G. S.; CHIARI, B. G.; ALMEIDA, M. G. J.; ISAAC, V. L. B.; VARGAS, M. D.; CICARELLI, R. M. B. Synthesis and tripanocidal activity of

ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24 (7), p. 1707-1710, 2014.

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

World Health Organization, WHO, Chagas disease in Latin American: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly epidemiological record**. v. 90, p. 33-44, 2015.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**. v. 57, p. 105 – 109, 2008.

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.

CAPÍTULO 2

Artigos publicados

- 1- VELÁSQUEZ, A. M. A.; FRANCISCO, A. I.; KOHASTSU, A. A. N.; SILVA, F. A. J.; RODRIGUES, D. F.; TEIXEIRA, R. G. S.; CHIARI, B. G.; ALMEIDA, M. G. J.; ISAAC, V. L. B.; VARGAS, M. D.; CICARELLI, R. M. B. Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24 (7), p. 1707-1710, 2014.
- 2- MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; MAGALHÃES, N. O.; ALMEIDA, A. E.; PIETRO, R. C. L. R.; SILVA, F. A. J.; CICARELLI, R. M. B. In vitro trypanocidal activity pf solamargine and extracts from Solanum palinacanthum and Solanum lycocarpum of brazilian cerrado. **Anais as Academia Brasileira de Ciências (Annais of the Brazilian Academy of Sciences)**. v.85, p. 903-907, 2013.

Artigos submetidos

- 1- RODRIGUES, D. F.; MANISCALCO, D. A.; SILVA, F. A. J.; CHIARI, B. G.; CASTELLI, M. V.; ISAAC, V. L. B.; CICARELLI, R. M. B.; LOPEZ, S. N.; Trypanocidal activity, trans-splicing effect and cytotoxicity of flavokawin B isolated from Polygonum ferrugineum Wedd. (Polygonaceae). **Parasitology Research**.