

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

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

ATIVIDADE DE DERIVADOS BENZOFUROXÂNICOS NA EXPRESSÃO DA
ENZIMA TRIPAREDOXINA PEROXIDASE MITOCONDRIAL DE FORMAS
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Araraquara - SP

2017

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

**ATIVIDADE DE DERIVADOS BENZOFUROXÂNICOS NA EXPRESSÃO DA
ENZIMA TRIPAREDOXINA PEROXIDASE MITOCONDRIAL DE FORMAS
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Doutor em Biociências
e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de
concentração Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara - SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K179a Kohatsu, Andréa Akiko Nakaima
Atividade de derivados benzofuroxânicos na expressão da enzima triparedoxina peroxidase mitocondrial de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* / Andréa Akiko Nakaima Kohatsu. – Araraquara, 2017.
17 + 111 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Biologia Molecular.

Orientadora: Regina Maria Barretto Cicarelli.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Derivados benzofuroxânicos. 3. Triparedoxina peroxidase mitocondrial. I. Cicarelli, Regina Maria Barretto, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4440

CAPES: 40300005



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CÉRTIFICADO DE APROVAÇÃO

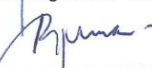
TÍTULO DA TESE: Atividade de derivados benzofuroxânicos na expressão da enzima triparedoxina peroxidase mitocondrial de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

AUTORA: ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

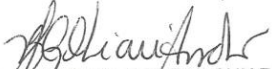
ORIENTADORA: REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI

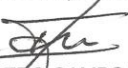
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI
Depto de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profa. Dra. RAQUEL REGINA DUARTE MOREIRA
Depto de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP- Araraquara


Prof. Dr. OTAVIO HENRIQUE THIEMANN
Depto de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física- USP -São Carlos


Profa. Dra. BRUNA GALDORFINI CHIARI ANDRÉO
Depto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara-UNIARA


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Depto de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 06 de dezembro de 2017

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos espíritos que permitiram este trabalho ser concretizado.

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.

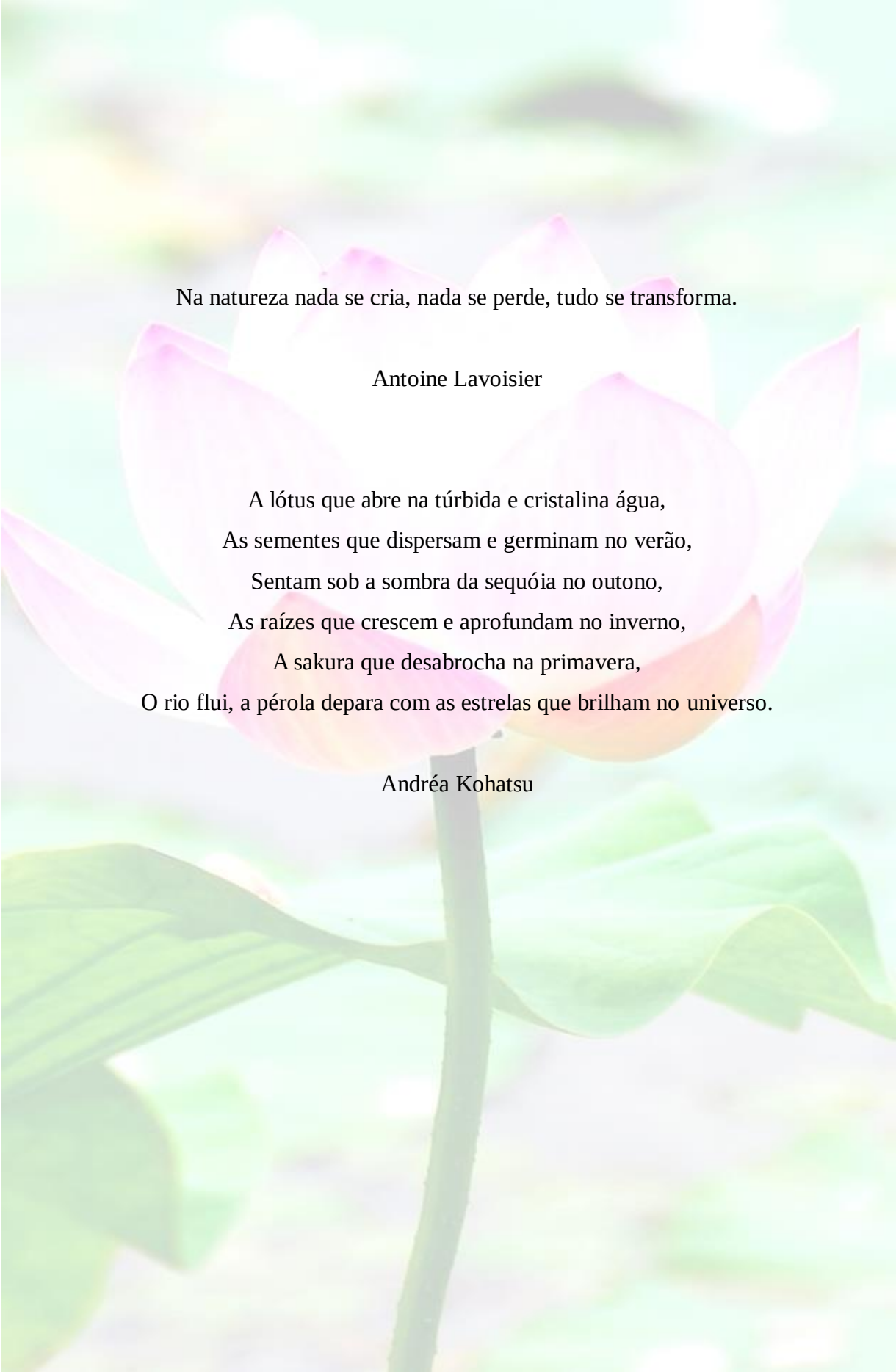
À professora Dra. Man Chin Chung e à professora Dra. Vera Lucia Borges Isaac, por terem cedido as substâncias e as células de hepatoma humano, respectivamente, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Flávia, Priscila e Bruna pelo auxílio nos experimentos. Ao Marco Túlio e Aline pelas discussões científicas que foram de grande importância para o meu aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (Fundunesp) pelo auxílio financeiro.

A todos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos pelo auxílio, 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 e sempre me apoiaram e auxiliaram.



Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.

Antoine Lavoisier

A lótus que abre na túrbida e cristalina água,
As sementes que dispersam e germinam no verão,
Sentam sob a sombra da sequóia no outono,
As raízes que crescem e aprofundam no inverno,
A sakura que desabrocha na primavera,
O rio flui, a pérola depara com as estrelas que brilham no universo.

Andréa Kohatsu

RESUMO (ABSTRACT)

RESUMO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é endêmica nas Américas, porém outros modos de transmissão dispersaram a enfermidade às regiões onde não ocorre o vetor triatomíneo hematófago. No momento há apenas dois fármacos para o tratamento da doença, benzonidazol e nifurtimox, porém nifurtimox não é mais utilizado no Brasil. Ambos os medicamentos tem ações limitadas, dependem da fase da doença e apresentam efeitos adversos severos, além dos mecanismos de ação não serem totalmente conhecidos. Estudos relacionam a resistência ao benzonidazol com o aumento na produção de triparedoxina peroxidase mitocondrial (mTcTXNPx) que minimiza os efeitos tóxicos de espécies reativas de oxigênio, apresenta atividade peroxidase e peróxinitrito redutase. Derivados benzofuroxânicos, por conter estrutura heterociclo *N-óxido* relacionada com a oxidação de biomoléculas, tem apresentado atividade anti *Leishmania* e tumoral, bacteriostática e fungistática. No presente estudo, derivados benzofuroxânicos (*N-óxido*-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol), inéditos isómeros de nitrofural, foram avaliados a partir de ensaios citotóxicos *in vitro*, na forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*. Os derivados benzofuroxânicos foram tóxicos para *T. cruzi*, IC₅₀ menor em relação ao benzonidazol, mas não foram tóxicos para células de mamíferos HepG2, o que indica serem promissoras moléculas tripanossomicidas. Também foram detectados o monômero de mTcTXNPx de 25,5 kDa e o dímero de aproximadamente 58 kDa em condições redutoras mantidas por 2-mercaptoetanol. Apesar de não ter ocorrido aumento na expressão de mTcTXNPx de 25,5 kDa, a partir dos extratos totais protéicos purificados de *T. cruzi* tratado com BZTS, verificou-se a presença do dímero de aproximadamente 58 kDa, sugerindo expressão da proteína.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; derivados benzofuroxânicos; triparedoxina peroxidase mitocondrial

ABSTRACT

Chagas disease or American trypanosomiasis is endemic in Americas, however distinct mechanisms have dispersed the illness to the regions where the hematophagous triatomine vector does not occurs. At moment there are only two drugs available to treat the disease, benznidazole and nifurtimox, but nifurtimox is not prescribed in Brazil. Both medicines have limited actions, depend on disease phase and have severe adverse effects, moreover the mechanism of action do not well understood. Studies have described the benznidazole resistance would be related to increasing expression of mitochondrial tryparedoxin peroxidase (mTcTXNPx) which decreasing toxic effects of reactive oxygen species, has peroxidase and peroxinitrite reductase activity. Benzofuroxans derivative contain N-oxide heterocycle structure related to the oxidation of biomolecules, have shown anti-Leishmania activity and tumoral, bacteriostatic and fungistatic. In the present study, benzofuroxanic derivatives (N-oxide-benzo [1,2-c] 1,2,5-oxadiazole), novel nitrofural isosteres, were evaluated from *in vitro* cytotoxic assays on the epimastigote form of strain Y of *T. cruzi*. The benzofuroxanic derivatives were toxic to *T. cruzi*, IC₅₀ lower than benznidazole, although were not toxic to mammalian HepG2 cells, indicating promising trypanocidal molecules. Also, were detected the 25.5 kDa mTcTXNPx monomer and the dimer of approximately 58 kDa under reducing conditions maintained by 2-mercaptoethanol. Although there was no increased in 25.5 kDa mTcTXNPx expression, the presence of the dimer of approximately 58 kDa was verified from purified *T. cruzi* total protein extracts treated with BZTS suggesting its expression.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; benzofuroxan derivatives; mitochondrial tryparedoxin peroxidase

LISTAS E SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Carlos Chagas (1879-1934)	19
Figura 2: Moradia tipo pau a pique na região estudada por Carlos Chagas	20
Figura 3: Distribuição mundial da doença de Chagas	21
Figura 4: Manifestações clínicas da doença de Chagas na fase aguda e crônica	23
Figura 5: Imunopatogênese da lesão ao miocárdio	25
Figura 6: Tripanosomatídeos em seus estágios parasitários	26
Figura 7: Esquema do corpo celular da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	27
Figura 8: Morfologia de <i>T. cruzi</i>	28
Figura 9: Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> no inseto vetor e no mamífero hospedeiro	29
Figura 10: Distribuição geográfica de triatomíneos	30
Figura 11: Distribuição geográfica de <i>T. cruzi</i> em DTUs nos ciclos silvestres e domésticos	31
Figura 12: Estruturas químicas de nifurtimox (NFT) e benzonidazol (BZ)	32
Figura 13: Ação de benzonidazol e nifurtimox	34
Figura 14: Reações de redução do benzonidazol	35
Figura 15: Processo bio redutor de nitro compostos	36
Figura 16: Rotas aeróbia e anaeróbia do metabolismo de nitrocompostos	37
Figura 17: Síntese de hidroximetilnitrofural	38
Figura 18: Mecanismo proposto para liberação de NO dependente de tiol por núcleo furoxânico	39
Figura 19: Síntese de derivados benzofuroxânicos	40
Figura 20: Reações da síntese de derivados benzofuroxânicos	40
Figura 21: Via oxidativa aeróbia, redução do oxigênio e produção de EROs e ERNs	41
Figura 22: Reparo na lesão de 8-oxoguanina no DNA	43
Figura 23: Lise de <i>T. cruzi</i> dependente de peroxinitrito	44
Figura 24: Cadeia respiratória em <i>T. cruzi</i>	46
Figura 25: Sistema de tiol peroxidases em <i>T. cruzi</i>	48
Figura 26: Enzimas dos processos antioxidativos	49
Figura 27: Distribuição subcelular em <i>T. cruzi</i> (citossol, mitocôndria e retículo endoplasmático) de enzimas do sistema antioxidante	50
Figura 28: Forma protonada e desprotonada do resíduo de cisteína	51

Figura 29: Mecanismo da reação catalítica de TXNPx (Prx)	52
Figura 30: Mecanismo catalítico de TXNPx (2-Cys típica)	53
Figura 31: Reação de peroxidação realizada por TXNPx	54
Figura 32: Estruturas de 2-Cys típica TXNPx de parasitos eucariotos	55
Figura 33: Esquema da reação de um homodímero de 2-Cys típica TXNPx	56
Figura 34: Sítio ativo de TXNPx	57
Figura 35: Estruturas de peroxiredoxina de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 36: Estrutura decamérica da peroxiredoxina de <i>T. cruzi</i>	59
Figura 37: Função chaperona de mTXNPx em <i>Leishmania</i>	61
Figura 38: Estabilização da região I na conformação fechada	63
Figura 39: Funções dos íons $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}/\text{pH}$ e estado redox na manutenção da chaperona de TXNPx mitocondrial em <i>L. infantum</i>	64
Figura 40: Culturas de <i>T. cruzi</i> e HepG2 após a adição de MTT	78
Figura 41: Gráficos das porcentagens de viabilidade das células HepG2	85
Figura 42: Identidade da mTcTXNPx de <i>T. cruzi</i> , cepa Y, com triparedoxina peroxidase mitocondrial de outros tripanosomatídeos obtida pelo BLAST	91
Figura 43: Alinhamento múltiplo de triparedoxina peroxidase mitocondrial de <i>T. cruzi</i> com a de outros tripanosomatídeos	92
Figura 44: Alinhamento múltiplo de triparedoxina peroxidase mitocondrial de <i>T. cruzi</i> com a de outros tripanosomatídeos	93
Figura 45: Alinhamento de triparedoxina peroxidase	94
Figura 46: <i>Western blotting</i> da avaliação na expressão de mTcTXNPx	96
Figura 47: SDS-PAGE 10 %, corado com 0,1% de <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250, dos extratos totais (10 µg) de <i>T. cruzi</i>	97
Figura 48: <i>Western blotting</i> da reação do anticorpo anti mTcTXNPx (1:400) com os extratos totais (10 µg/poço) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , incubados em diferentes concentrações de agentes redutores	99
Figura 49: SDS-PAGE 10%, corado com 0,1% <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250, da purificação do anticorpo anti mTcTXNPx (5 µg) por cromatografia de afinidade com proteína A	101
Figura 50: <i>Western blotting</i> dos extratos totais (10 µg) da cepa Y de <i>T. cruzi</i> incubados com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400)	102
Figura 51: SDS-PAGE 10%, corado com 0,1% <i>Coomassie Blue</i> R-250, dos extratos totais	

protéicos	105
Figura 52 SDS-PAGE 10%, corado com 12 mM AgNO ₃ , da purificação do extrato total (2,5 µg) por cromatografia de afinidade com CNBr TM (GE Healthcare)	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações dos ensaios citotóxicos em <i>T. cruzi</i> e células HepG2	77
Tabela 2: Concentrações inibitórias e índice de seletividade de derivados benzofuroxânicos	87
Tabela 3: Contagem de <i>T. cruzi</i> após tratamento	96
Tabela 4: Tamanhos de triparedoxina peroxidase mitocondrial (mTcTXNPx) e citosólica (cTcTXNPx) de <i>T. cruzi</i>	102
Tabelas anexas.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZ	Benzonidazol
BZFS	6-((metil)benzo[<i>c</i>](2-carbamoilidrazona)-1- <i>N</i> -óxido-1,2,5-oxadiazol
BZTS	6-((metil)benzo[<i>c</i>](2-carbamotiolidrazona)-1- <i>N</i> -óxido-1,2,5-oxadiazol
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CO ₃ ^{•-}	Radical bicarbonato
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FFMS	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
FMN	Flavina mononucleotídeo
FPVD	Fluoreto de polivinilideno
g (FCR)	Força centrífuga relativa
HCAPS	Hidrato de 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanosulfonato
HepG2	Célula de hepatoma humano
IgG	Imunoglobulina G
iNOs	Óxido nítrico sintase
IS	Índice de segurança
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
Luminol	5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona
min	Minuto
MSF	Metosulfato de fenazina
mTcTXNPx	Triparedoxina peroxidase mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-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
•NO	Óxido nítrico
•NO ₂	Dióxido de nitrogênio
ONOO ⁻	Peróxinitrito
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
P _i	Fosfato inorgânico
PSA	Persulfato de amônio
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TFS	Tampão fosfato salino
TTS	Tampão tris salino
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina

SUMÁRIO

1.Introdução	19
1.1. Doença de Chagas	19
1.2. Fases aguda e crônica da doença de Chagas	22
1.3. Morfologia e ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.4. Diversidade populacional de <i>T. cruzi</i>	30
1.5. Tratamento	32
1.6. Prospecção de substâncias anti <i>T. cruzi</i>	35
1.6.1. Compostos nitroheterocíclicos	36
1.6.2. Derivados benzofuroxânicos	38
1.7. Metabolismo oxidativo	41
1.8. Mitocôndria de Tripanosomas	45
1.8.1. Cadeia respiratória	45
1.9. Proteínas do metabolismo oxidativo e alvos moleculares	47
1.9.1. Triparedoxina peroxidase (peroxiredoxina)	51
2. Justificativa	65
3. Objetivos	68
3.1. Gerais	69
3.2. Específicos	69
4. Materiais e métodos	72
4.1. Meios de cultura, soluções e géis	73
4.2. Culturas de <i>T. cruzi</i> e células HepG2	75
4.3. Avaliação da citotoxicidade em <i>T. cruzi</i> e células HepG2	75
4.4. Exposição de <i>T. cruzi</i> aos derivados benzofuroxânicos	79

4.5. Análise da sequência de mTcTXNPx	79
4.6. Análise da expressão de mTcTXNPx	79
4.7. Avaliação da condição redutora por DTT ou 2-mercaptoetanol	80
4.8. Purificação de anticorpo anti mTcTXNPx	80
4.9. Confirmação da purificação e reatividade do anticorpo anti mTcTXNPx	81
4.10. Quantificação das proteínas no extrato total e do anticorpo anti mTcTXNPx purificado	81
4.11. Purificação de extrato total	82
4.12. Confirmação da purificação do extrato total	83
 5. Resultados e discussão	 84
5.1. Avaliação da citotoxicidade em <i>T. cruzi</i> e células HepG2	85
5.2. Análise da sequência de mTcTXNPx	90
5.3. Análise da expressão de mTcTXNPx	95
5.4. Avaliação da condição redutora por DTT ou 2-mercaptoetanol	98
5.5. Purificação do anticorpo anti mTcTXNPx	100
5.6. Confirmação da reatividade do anticorpo anti mTcTX purificado	101
5.7. Purificação de extrato total	104
 6. Conclusões	 107
 Referências	 109

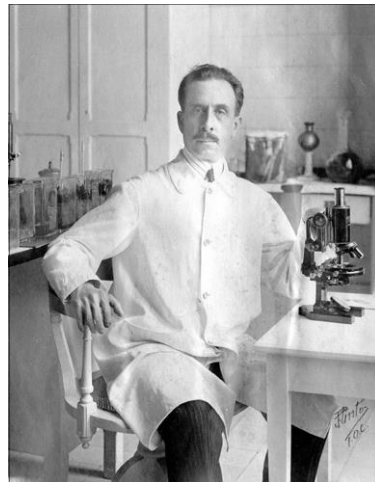
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descrita por Carlos Chagas (Figura 1) em 1909, um grande marco na história da biologia de parasitos e patologia humana parasítica. Pela primeira vez, o mesmo pesquisador descreve o parasito causador, o vetor, os animais que podem ser infectados pelo parasito, as morfologias do parasito, o ciclo doméstico e selvagem do parasito e da doença, os sintomas da doença e as fases aguda e crônica da doença. Em 1907, Chagas foi nomeado para uma campanha profilática anti malária na região norte do estado de Minas Gerais, na cidade de Lassance próxima ao rio São Francisco, onde a malária devastava a população e estava em construção a Estrada de Ferro Central Brasileira. Nesse local, Chagas deparou-se com um novo parasito que denominou *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu professor Oswaldo Cruz. Esse parasito foi encontrado em insetos hematófagos conhecidos popularmente como “bicho barbeiro”, viviam nas frestas e telhas das habitações (Figura 2) de palha e barro (LEWINSOHN, 1981; COURA, 2013).

Figura 1: Carlos Chagas (1879-1934).



Fonte: Disponível em <<http://www.coc.fiocruz.br/index.php/carlos-chagas#menu-galerias>>. Acesso em: 16 setembro de 2017.

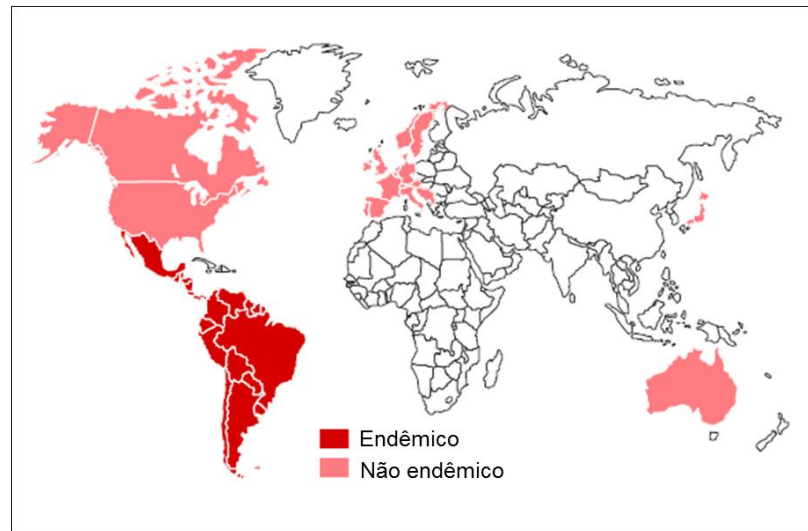
Figura 2: Moradia tipo pau a pique na região estudada por Carlos Chagas.



Fonte: Disponível em <<http://www.coc.fiocruz.br/index.php/carlos-chagas#menu-galerias>>. Acesso em: 16 setembro de 2017.

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica na América Latina (JANNIN; VILLA, 2007; SCHMUNIS, 2007; PEREIRA; NAVARRO, 2013). O número de pessoas infectadas no mundo (Figura 3) é estimado em torno de 6 a 7 milhões (WHO, 2017), aproximadamente 7.000 pessoas morrem ao ano e 25 milhões de pessoas estão sob o risco de contágio (WHO, 2015a). Os maiores números de casos ocorrem na Argentina (1,5 milhão), Brasil (1,1 milhão) e México (876 mil) (WHO, 2015b). A doença está classificada como doenças tropicais negligenciadas (ascaridíase, ancilostomíase, tricuriase, filariose linfática, oncocercose, dracunculíase, 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; HOTEZ et al., 2016).

Figura 3: Distribuição mundial da doença de Chagas em áreas endêmicas e não endêmicas.



Fonte: Modificado de Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDI). Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>>. Acesso em: 14 agosto 2017.

A transmissão da enfermidade pode ocorrer por meio de insetos vetores, via transfusão sanguínea, via congênita, por transplante de órgãos ou acidental, geralmente em laboratórios ou em cirurgias de pacientes infectados, (CURA et al., 2013) e oral, por ingestão de alimentos e bebidas que contém fezes contaminadas com tripomastigotas infectantes (STEINDEL et al., 2008; BASTOS et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Ao se considerar a infecção por via alimentar, a doença de Chagas pode ser classificada como a oitava no mundo entre as doenças parasitárias transmitidas por alimentos contaminados por insetos (ROBERTSON et al., 2016). Movimentos migratórios levaram *T. cruzi* para regiões onde não ocorre o vetor, como Austrália e Nova Zelândia (JACKSON et al., 2014), Japão (IMAI et al., 2014), Espanha, França, Itália, Reino Unido, Suíça, Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia. Nessas regiões, a transmissão ocorre, principalmente, por transfusão de sangue, vertical da mãe para a criança, transplante de órgãos e acidentes em laboratórios (SCHMUNIS; YADON, 2010; STRASEN et al., 2014).

1.2. Fases aguda e crônica da doença de Chagas

A fase inicial da infecção dura de 4 a 8 semanas, e a fase crônica persiste por toda a vida do hospedeiro. Durante a fase aguda a taxa de mortalidade é baixa (<5-10% dos casos sintomáticos), resultante da severa miocardite ou meningoencefalite, ou ambos. Em torno de 60-70% dos pacientes na fase aguda não desenvolvem manifestações clínicas da doença. Esses pacientes apresentam a forma indeterminada da fase crônica da doença, caracterizada por anticorpos positivos anti *T. cruzi* presentes no soro, eletrocardiograma normal, exames radiológicos normais do peito, esôfago e cólon. Os 30-40% dos pacientes desenvolvem a forma determinada da fase crônica, problemas cardíacos, digestivos ou cardiodigestivos, geralmente 10-30 anos após a infecção inicial (Figura 4). A reativação pode ocorrer em pacientes crônicos que apresentam sistema imunológico comprometido, como pacientes portadores do vírus HIV ou que recebem medicamentos imunossupressores, ocorre aumento na parasitemia e replicação intracelular do parasito (RASSI JÚNIOR et al., 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

A fase aguda geralmente é assintomática, os sintomas quando ocorrem podem ser: febre, mal estar, hepatoesplenomegalia (aumento no tamanho do fígado e rim) e aumento no tamanho dos linfonodos, edema subcutâneo (localizado ou generalizado), e no caso da transmissão vetorial, o sinal da porta de entrada de *T. cruzi* através da pele (chagoma) ou via ocular através da membrana mucosa (sinal de Romana). Os sintomas podem aparecer de 1 ou 2 semanas após a infecção, no caso da transmissão vetorial, ou após alguns meses, no caso da transmissão por doação de sangue (RASSI JÚNIOR et al., 2010).

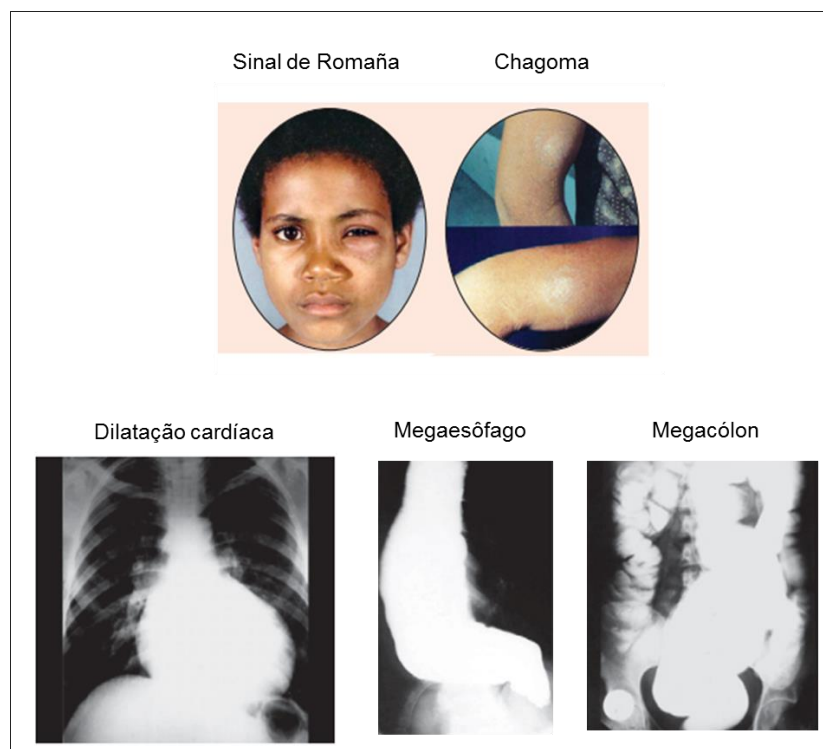
Apesar da patogênese da fase crônica não ser completamente entendida, acredita-se que a persistência do parasito é necessária para o desenvolvimento da doença. Porém não se sabe se os danos aos tecidos são ocasionados diretamente pelo parasito ou indiretamente pela interação do parasito com o sistema imunológico do hospedeiro ou a resposta auto imune (RASSI JÚNIOR et al., 2010).

Uma das características mais marcantes da fase crônica é a deterioração progressiva da função cardíaca, derivada principalmente do desarranjo estrutural, como consequência do intenso processo inflamatório (GUTIERREZ et al., 2009), o que leva ao comprometimento da função contrátil e a dilatação das quatro câmaras e aneurisma apical do ventrículo esquerdo. Ocorre uma destruição das células miocárdiais, fibrose difusa, edema e infiltração celular mononuclear no miocárdio. Por isso, a ocorrência de bloqueio atrioventricular e

intraventricular, disfunção do nó sinusal e tromboembolismo. Essa destruição progressiva do tecido cardíaco e a intensa fibrose devido a morte dos miócitos conduzem a insuficiência cardíaca, bradiarritmia e taquiarritmia no paciente que pode vir a óbito subitamente. Embolias sistêmica e pulmonar são decorrentes do aumento de trombo mural na câmara cardíaca (RASSI JÚNIOR et al., 2010).

As lesões gastrointestinais são ocasionadas pela destruição de gânglios autônomos intramurais. No megaesôfago ocasiona disfagia com odinofagia, combinado com dores epigástricas, regurgitação, ptialismo e má nutrição. No megacólon geralmente afeta o segmento sigmoide, reto, cólon descendente ou ambos, produz obstipação prolongada, distensão abdominal, e ocasionalmente obstrução severa devido ao fecaloma (RASSI JÚNIOR et al., 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

Figura 4: Manifestações clínicas da doença de Chagas na fase aguda e crônica. Sinais da porta de entrada de *T. cruzi*, sinal de Romaña e chagoma, presentes em lesões na mucosa e pele, respectivamente. Coração, esôfago e cólon dilatados.



Fonte: Modificado de Rassi Júnior et al., 2010.

Supõe-se que em ambiente de predominância inflamatória na fase crônica determinada está associado com as formas sintomáticas cardíacas e digestivas. Enquanto que em ambiente

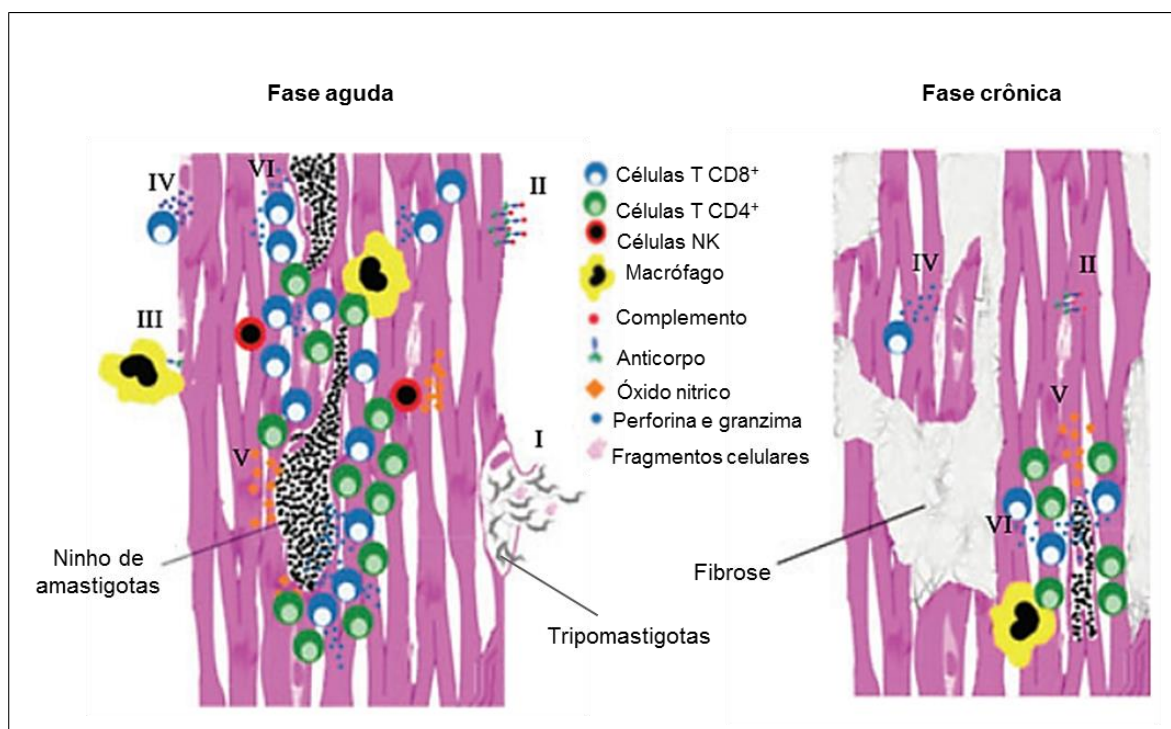
de predominância anti inflamatória está associado com a forma indeterminada. Na forma indeterminada assintomática existe uma relação de maior produção de citocina anti inflamatória, interleucina IL-10, em relação às citocinas inflamatórias, como interferon gama - IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa - TNF- α (ANDRADE et al., 2014).

O mecanismo exato que medeia o controle parasitário ainda não está bem esclarecido, acredita-se que depende principalmente do sistema imune inato, como células *natural killer* (NK), neutrófilos e macrófagos. Células NK são importantes fontes de IFN- γ e TNF- α que são essenciais para a ativação de macrófagos. Citocinas pró-inflamatórias são liberadas por macrófagos e células NK em resposta a moléculas presentes na superfície de *T. cruzi*, mucinas glicosilfosfatidilinositol (GPI), envolvida na adesão do parasito à célula hospedeira. O sistema imune adaptativo é aprimorado com as células B ativas circulantes. No início da infecção, aproximadamente após 15 dias, anticorpos imunoglobulinas IgM e IgG são encontrados no soro do paciente (ANDRADE et al., 2014).

IFN- γ é sintetizada após a infecção em resposta à interleucina (IL-12) e TNF- α . Células T CD4⁺ e CD8⁺ também produzem IFN- γ . Em ação conjunta, TNF- α e IFN- γ induzem a ativação de óxido nítrico sintase (iNOS) que catalisa a síntese de óxido nítrico (Figura 5) por macrófagos para inibir a replicação do parasito (GUTIERREZ et al., 2009).

Acredita-se que a autoimunidade pode ocorrer devido a tolerância do tecido cardíaco aos danos iniciais. Porém, essa auto tolerância é rompida, o que resulta numa reação imune contra as próprias proteínas do hospedeiro. A autoimunidade pode ser iniciada pelas lesões induzidas pelo parasito aos cardiomiócitos e/ou mimetismo molecular entre epítomos de proteínas dos parasitos e do hospedeiro. As respostas imunes parasito-específicas e, posteriormente, não específicas, resultam na liberação de auto antígenos num ambiente rico em mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, linfotoxinas e óxido nítrico. Nesse ambiente, os potentes estimuladores imunes, podem ativar linfócitos T; uma vez ativados, os linfócitos autorreativos podem proliferar em resposta a auto antígenos presentes em células apresentadoras de antígeno (BONNEY; ENGMAN, 2015).

Figura 5: Immunopatogênese da lesão ao miocárdio. I: A lesão ao tecido cardíaco inicia com a multiplicação de *T. cruzi* que conduz à destruição do cardiomiócito. Inicia-se uma resposta imune específica contra os parasitos, porém a liberação de componentes celulares da célula hospedeira leva a uma resposta imune contra os componentes das células hospedeiras. II: Auto anticorpos podem gerar lesões que medeiam a atividade do sistema complemento. III: Macrófagos ativados realizam a opsonização. II e III: Essa ativação e mimetismo molecular entre parasitos e antígenos hospedeiros geram auto anticorpos. IV: Células T CD8⁺ reconhecem auto anticorpos e destroem o tecido cardíaco. V: Tecido injuriado conduz a produção de TNF- α o que resulta na produção de óxido nítrico. A infecção por *T. cruzi* também leva a produção de óxido nítrico, responsável pela geração do extenso dano cardíaco devido ao estresse oxidativo. VI: Linfócitos T citolíticos destroem as células infectadas e as células adjacentes. O processo imunopatológico continua durante a fase crônica, apesar do baixo nível de parasitemia, com progressivo processo inflamatório por anos e resulta em fibrose e a dilatação do miocárdio.



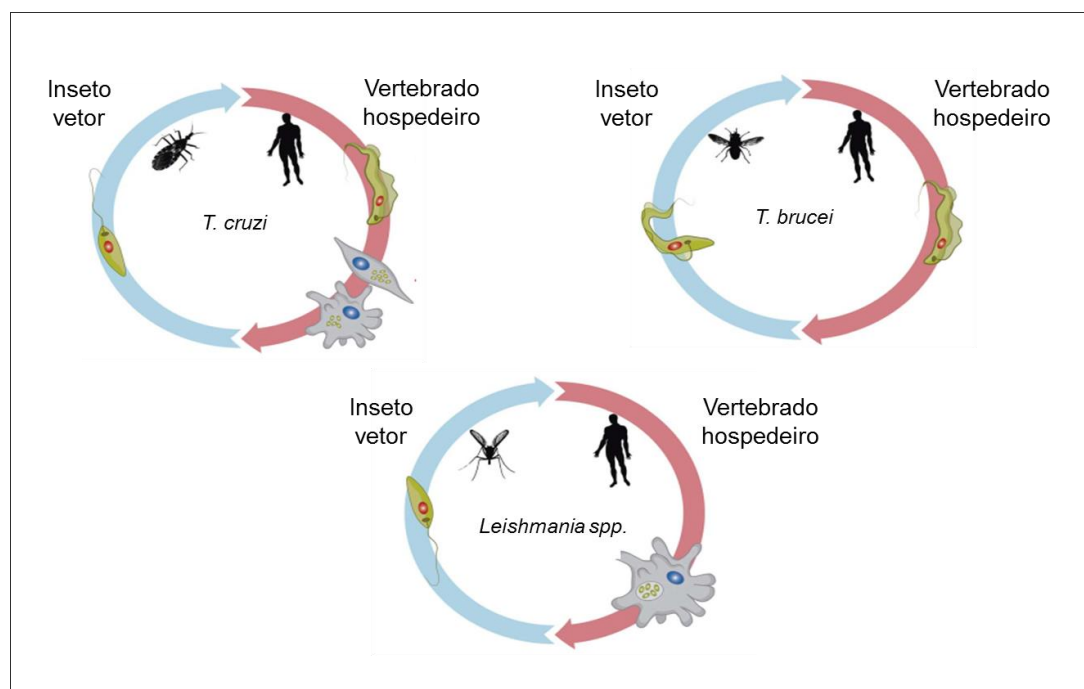
Fonte: Modificado de Gutierrez et al., 2009.

1.3. Morfologia e ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas (tripanossomíase americana) é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (JANNIN; VILLA, 2007; SCHMUNIS, 2007), ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (RASSI et al., 2012) da qual fazem parte os causadores da doença do sono ou tripanossomíase africana - *T. brucei gambiensis*, *T. brucei rhodesiensis*, e da leishmaniose - espécies de *Leishmania* (Figura 6), caracterizada pela

presença de um único flagelo e mitocôndria que contém o cinetoplasto (TEIXEIRA et al., 2012).

Figura 6: Tripanosomatídeos em seus estágios parasitários. A: *T. cruzi*. B: *T. brucei*. C: *Leishmania* spp. À direita estão as formas encontradas no mamífero hospedeiro. Em *T. cruzi* são tripomastigotas intracelulares (macrófagos) e amastigotas intracelulares (células nucleadas). Em *T. brucei* são tripomastigotas extracelulares (sanguíneos). Em *Leishmania* spp., amastigotas intracelulares (macrófagos). À esquerda, estão as formas encontradas no inseto vetor. Em *T. cruzi*, são epimastigotas encontradas em triatomíneos, principais espécies são *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. Em *T. brucei*, as formas procíclicas são encontradas na mosca tsé tsé do gênero *Glossina*. Em *Leishmania* spp., promastigotas em mosquitos palha dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.



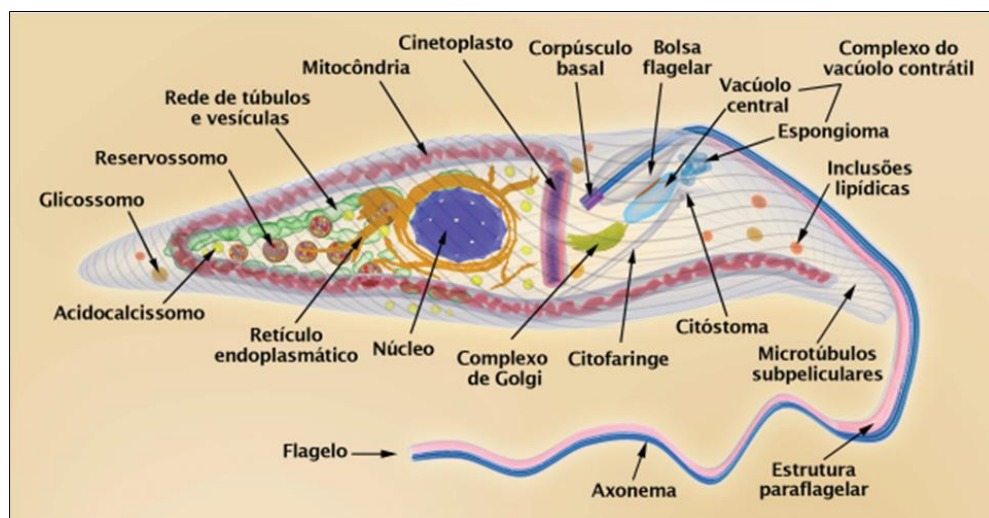
Fonte: Modificado de Bartholomeu et al., 2014.

Essa ordem apresenta uma única e ramificada mitocôndria, com muitas cristas (Figura 7). Na matriz mitocondrial há uma região de DNA condensado, denominado cinetoplasto. A morfologia do cinetoplasto varia de acordo com o estágio de desenvolvimento: em epimastigotas e amastigotas apresenta forma de bastão, enquanto em tripomastigotas é arredondada (DE SOUZA et al., 2009).

A mitocôndria contém uma membrana externa, uma densa matriz e uma membrana interna que forma finas dobras internas. Dentro da matriz mitocondrial está o cinetoplasto, contém o DNA mitocondrial, composto por moléculas circulares, maxicírculos e minicírculos (TOMÁS; CASTRO, 2013) que representam aproximadamente 30% do genoma total.

Maxicírculos codificam genes do complexo da cadeia respiratória, como citocromo oxidase, NADH desidrogenase e subunidades de ATP sintase. Minicírculos produzem RNAs que atuam no processamento de edição, inserção ou remoção de resíduos de uridilatos, para criar RNAs funcionais dos genes codificados pelos maxicírculos (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

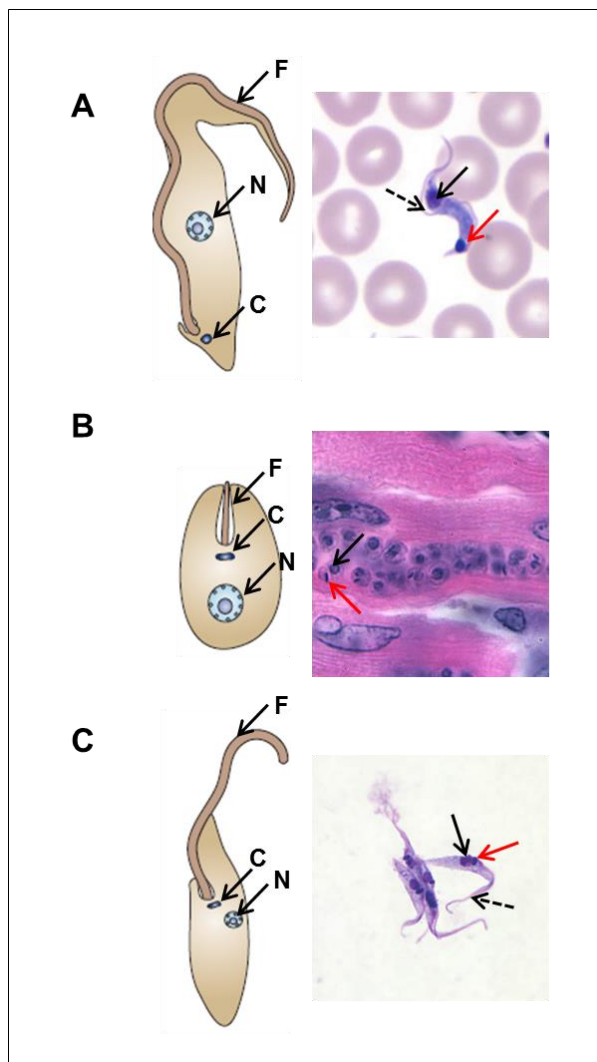
Figura 7: Esquema do corpo celular da forma epimastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Teixeira et al., 2011.

O parasito apresenta três formas distintas. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 8A) possuem a membrana ondulante e o cinetoplasto posicionado entre o núcleo e a região posterior. As formas amastigotas (Figura 8B) apresentam o núcleo grande, circular e excêntrico. As formas epimastigotas (Figura 8C) apresentam o cinetoplasto anterior ao núcleo e o flagelo emerge na extremidade anterior do parasito. (DE SOUZA, 2000).

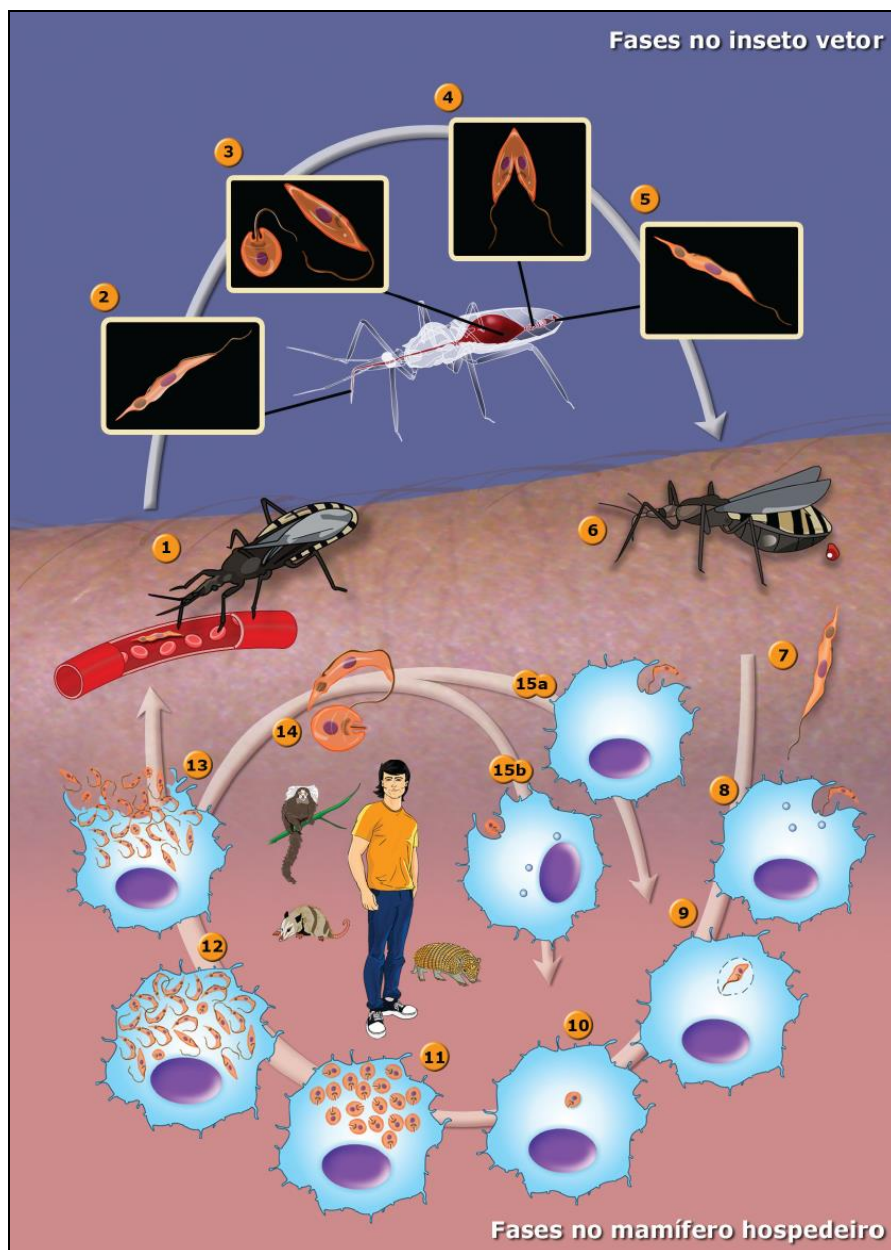
Figura 8: Morfologia de *T. cruzi*. (A) Tripomastigota no sangue. (B) Amastigota em tecido cardíaco. (C) Epimastigota em meio de cultura. As setas indicam, (vermelho - C) cinetoplasto, (preto - N) núcleo e (preto tracejado - F) flagelo.



Fonte: Modificado de Do Campo et al., 2005; Laboratory Identification of Parasitic Disease of Public Health Concern. Disponível em <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 16 setembro 2017. (A): Tripomastigota. (B): Amastigota. (C): Epimastigota. N/seta preta: núcleo; C/seta vermelha: cinetoplasto; F/seta tracejada: flagelo.

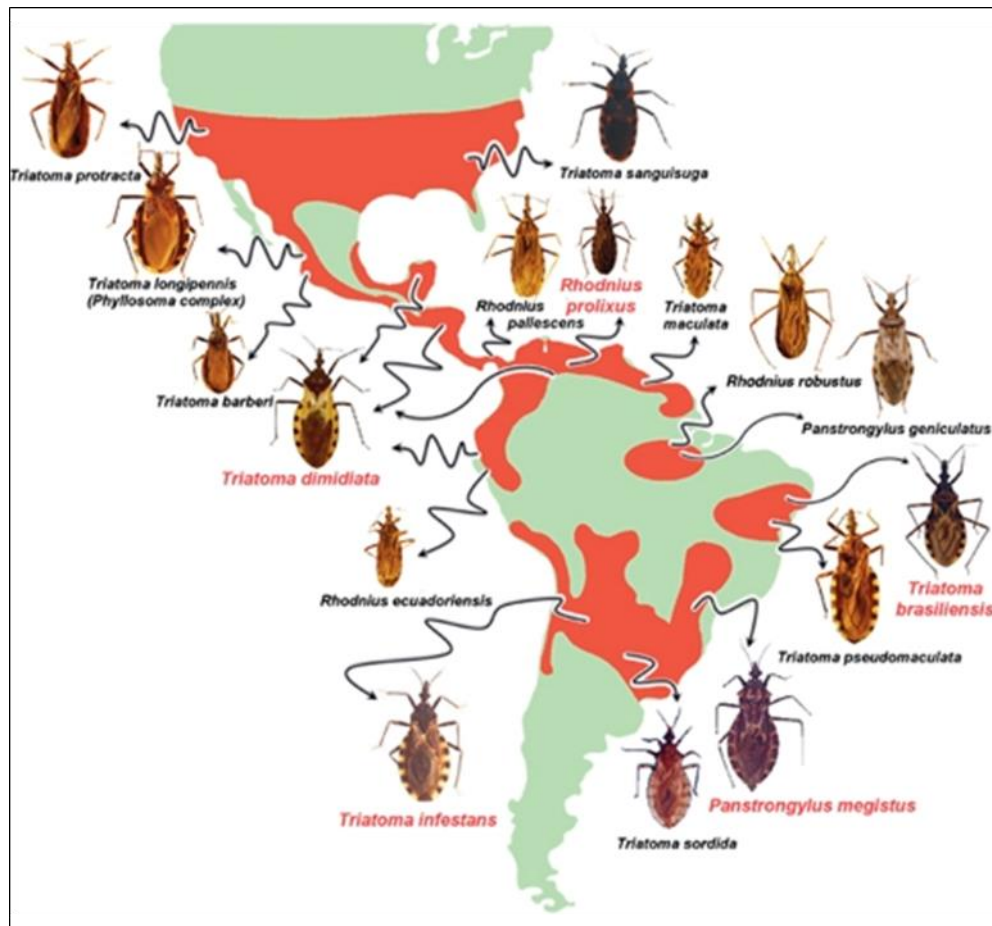
O ciclo de vida do parasito (Figura 9) é complexo e passa por distintos locais nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (TEIXEIRA et al., 2011). Alterna entre vertebrados das Ordens Marsupialia, Edentata, Chiroptera, Rodentia, Artiodactyla, Carnivora e Primates (HOARE, 1972; JANSEN; ROQUE, 2010) e insetos vetores hematófagos da família Reduviidae (Figura 10), cujos os principais gêneros são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (GOURBIÈRE et al., 2012).

Figura 9: Ciclo biológico de *T. cruzi* no inseto vetor e no mamífero hospedeiro. (1): Triatomíneo ao se alimentar do sangue de mamífero, infecta-se com as formas tripomastigotas sanguíneas. (2): As formas tripomastigotas são conduzidas à porção anterior do estômago. (3): As formas intermediárias esferomastigotas e epimastigotas são digeridas. (4): Epimastigotas sobreviventes alcançam o intestino e multiplicam-se por divisão binária. (5): Os epimastigotas ao atingir a região posterior do intestino se transformam em tripomastigotas metacíclicos. (6): O inseto ao se alimentar do sangue de mamífero, libera os tripomastigotas metacíclicos infectivos junto com as fezes. (7): Tripomastigotas invadem a região lesionada ou a mucosa do hospedeiro vertebrado. (8): Tripomastigotas caem na circulação sanguínea e invadem macrófagos. (9): Formação do vacúolo parasitóforo. (10): No interior do vacúolo parasitóforo, o tripomastigota diferencia-se em amastigota. (11): Multiplicação no citoplasma por divisões binárias. (12): Amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas. (13): Ocorre a lise da célula hospedeira e liberação dos tripomastigotas e de alguns amastigotas que ainda não diferenciaram. (14): Tripomastigotas e amastigotas no ambiente extracelular. (15a): Tripomastigotas e (15b): amastigotas infectam novas células.



Fonte: Teixeira et al., 2011.

Figura 10: Distribuição geográfica de triatomíneos. As áreas em vermelho indicam os locais de ocorrência. As espécies grifadas em vermelho são consideradas de maior importância.



Fonte: Gourbière et al., 2012.

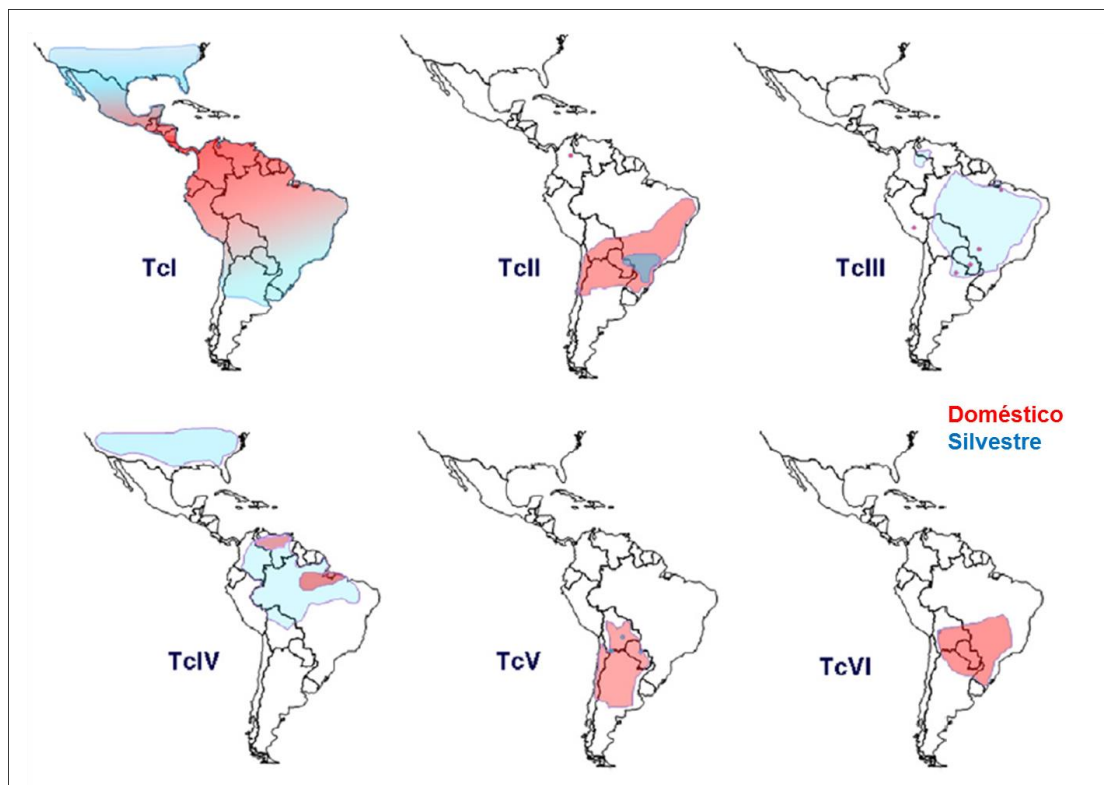
1.4. Diversidade populacional de *T. cruzi*

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. 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 24S α 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 IIe, também conhecidos por TcIV, TcII, TcIII, TcV e TcVI, respectivamente (ZINGALES et al., 2009).

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 11). 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 TcVI, a cardiopatia é severa e pode ocorrer conjuntamente com megaesôfago e megacólon (ZINGALES et al., 2012).

Figura 11: Distribuição geográfica de *T. cruzi* em DTUs nos ciclos silvestres e domésticos.

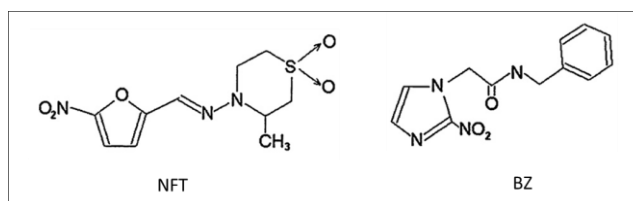


Fonte: Modificado de Zingales et al., 2012.

1.5. Tratamento

A doença de Chagas apresenta consideráveis desafios em termos de diagnóstico, controle vetorial e tratamento. A situação é agravada em virtude das cepas resistentes aos medicamentos; ainda é desconhecida se a resistência é adquirida ou uma variação natural (ALSFORD et al., 2013). Os únicos medicamentos (Figura 12) utilizados são nifurtimox (5-nitrofurano (3-metil-4-(5-nitrofurfurilideno)amino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), lançado em 1967 pela Bayer como Lampit®; e benzonidazol (2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida)), lançado em 1972 pela Roche como Rochagan®; posteriormente, a tecnologia foi transferida para Lafepe em Pernambuco, Brasil (JANIN; VILLA, 2007; URBINA, 2010). Desde a década de 80, a comercialização de nifurtimox foi descontinuada, primeiro no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai (COURA; CASTRO, 2002), porém tem sido utilizado na América Central e México (SOEIRO; DE CASTRO, 2011).

Figura 12: Estruturas químicas de nifurtimox (NFT) e benzonidazol (BZ).



Fonte: Modificado de Urbina, 2010.

A ação desses medicamentos é muito limitada (PINAZO et al., 2010; JACKSON et al., 2010), pois a eficácia do tratamento depende da fase da doença, da suscetibilidade da cepa, das condições fisiológicas do hospedeiro (COURA; CASTRO, 2002), da habilidade do parasito em suprimir a resposta imunológica do hospedeiro (NAGAJYOTHI et al., 2012) e as dificuldades de uso em pacientes imunodeprimidos e HIV positivos (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

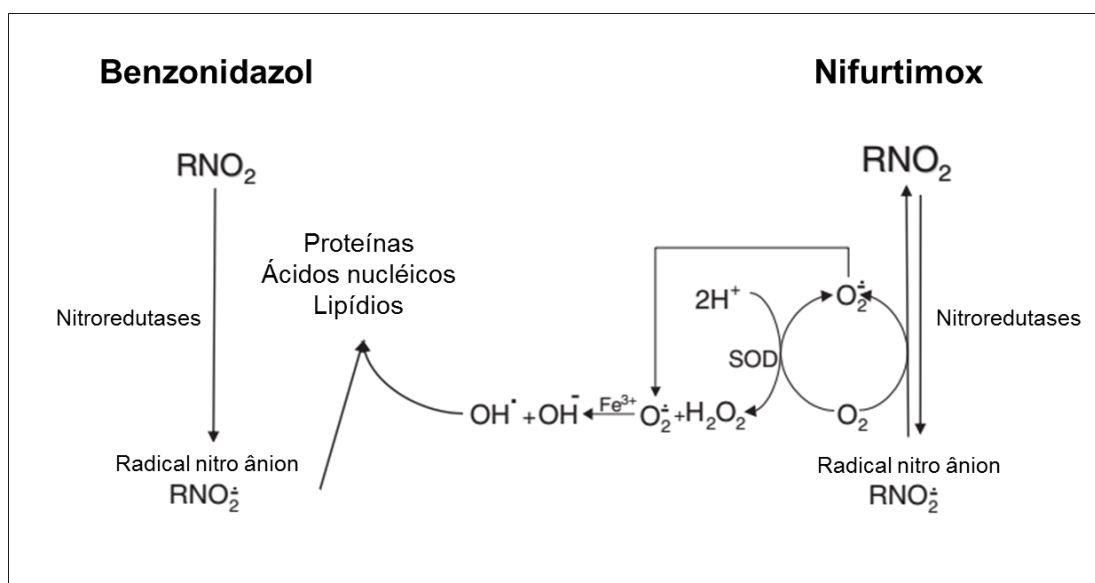
al., 2001). Acrescente-se a essas limitações, a falta de biomarcadores robustos na avaliação da cura (PINAZO et al., 2014; SANTAMARIA et al., 2014; PINAZO et al., 2015).

Além da escassez na diversidade de fármacos, também não há uma vacina disponível (DUMONTEIL et al., 2012; GUPTA et al., 2013). Um dos problemas que dificulta a obtenção de uma vacina são glicoproteínas e proteases presentes na superfície de membrana, como mucina (FERGUSON, 1997; DOS REIS, 2011) e cruzipáina (FERRÃO et al., 2015), respectivamente, que auxiliam na evasão ao sistema imunológico do hospedeiro.

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).

Nifurtimox e benzonidazol atuam na formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro de ambos os medicamentos é reduzido a grupo amino pela ação de nitroredutases, a reação é acompanhada pela formação de vários intermediários de radicais livres e metabólitos eletrofílicos. A reação inicia-se com a reação catalisada por NADPH-citocromo P-450 redutase que atua no grupo nitro ($R-NO_2$) do nifurtimox e benzonidazol, o que leva à produção de radicais intermediários de nitro ânion ($R-NO_2^{\bullet-}$). Este radical ao reagir com oxigênio molecular (O_2) regenera o medicamento (Figura 13). O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é dismutado a O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esses em presença de Fe^{+3} , formam o radical livre hidroxila ($\bullet OH$). Esses radicais, principalmente $\bullet OH$, ligam-se a lipídios, proteínas e DNA e provoca danos a essas moléculas (MAYA et al., 2007).

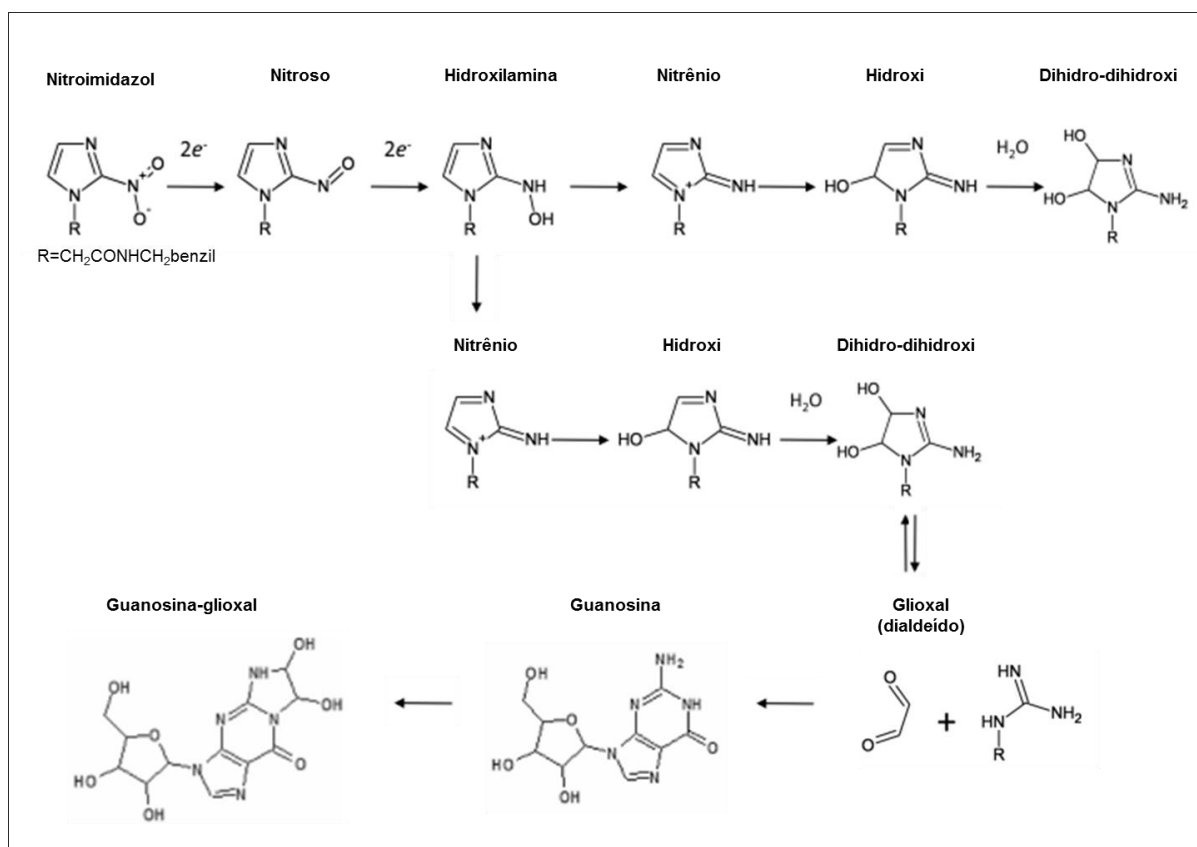
Figura 13: Ação de benzonidazol e nifurtimox. O grupo nitro de benzonidazol e nifurtimox é reduzido, a radicais livres e metabólitos eletrofílicos e radicais intermediários de nitro ânion ($R\text{-NO}_2^{\bullet-}$), por nitroredutases dependentes de citocromo P-450. $R\text{-NO}_2^{\bullet-}$ ao reagir com O_2 regenera o medicamento e produz $\text{O}_2^{\bullet-}$, dismutado por superóxido dismutase (SOD) e produz H_2O_2 . Radicais de nitro ânion ($R\text{-NO}_2^{\bullet-}$) e de hidroxila ($\bullet\text{OH}$) ligam-se a macromoléculas e provoca os danos.



Fonte: Modificado de Maya et al., 2007.

A atividade citotóxica de benzonidazol ainda não é bem elucidada. Sabe-se que a toxicidade de compostos nitroheterociclos que geralmente funcionam como pró-fármaco, depende da ativação por bio-redução dentro da célula do parasito por nitroredutase mitocondrial NADH-dependente, a qual utiliza flavina mono nucleotídeo (FMN) como co-fator. A etapa chave do processo é a redução do grupo nitro ligado ao anel aromático por nitroredutase tipo I, presente em procariotos e alguns protozoários parasitos, como *T. cruzi*, porém ausente em humanos. Essa nitroredutase ao realizar a transferência de elétrons ao substrato forma um intermediário nitroso (Figura 14). A seguir, mais uma etapa de redução ocorre e gera hidroxilamina que forma nitrênio, e este um derivado hidroxil. O derivado hidroxil ao receber água forma isômeros *cis* e *trans* de dihidro-dihidroxil que ao quebrar libera glioxal. A redução de benzonidazol produz glioxal, metabólito citotóxico, um di-aldeído capaz de formar aductos com proteínas, DNA e pequenas moléculas, como glutatona. Os efeitos deletérios de glioxal na célula seriam provocados pelas reações com as cadeias laterais de aminoácidos, o que levaria a inibição enzimática, ligação cruzada entre proteínas e degradação alterada de proteínas; enquanto que para os ácidos nucleicos promoveria ligação cruzada entre DNA e mutação (HALL; WILKINSON, 2012).

Figura 14: Reações de redução de benzonidazol. Redução de benzonidazol (nitroimidazol) leva a formação de dihidro-dihidroxi (forma *cis* ou *trans*) que ao ser quebrado forma glicoxal, forma aducto guanosina-glicoxal.



Fonte: Modificado de Hall; Wilkinson, 2012.

Benzonidazol é capaz de induzir a formação de deoxiguanosina trifosfato (8-oxoG), um 2'-deoxiribonucleosídeo-5'-trifosfato (dNTP) oxidado, substrato para a síntese de DNA. Esse dNTP oxidado pode incorporar ao DNA e ocasionar o pareamento errado com adenina, o que ocasiona mutação por transversão de AT para CG, quebras duplas na cadeia de DNA, desempacotamento da heterocromatina, perda do envoltório nuclear. O que não está elucidado é se essa oxidação é devido à ação direta dos intermediários de benzonidazol ou efeito colateral do estresse oxidativo gerado pelo medicamento (RAJÃO et al., 2014).

1.6. Prospecção de substâncias anti *T. cruzi*

Na busca por moléculas terapêuticas, a adição de um grupo nitro ocasiona mudanças químicas nas moléculas e altera a lipofilicidade e a solubilidade em água, dada a mudança na

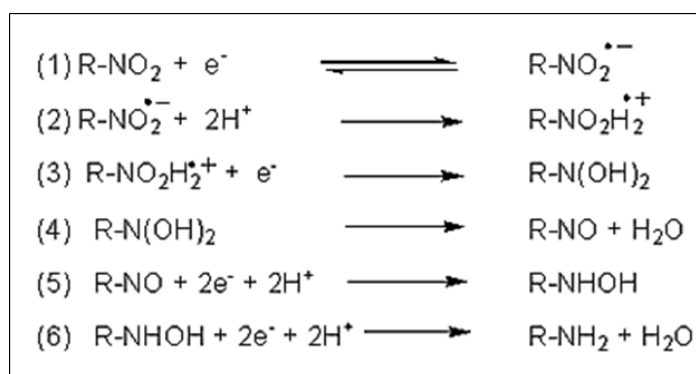
polaridade, e as propriedades eletrônicas e estéricas. A bio-redução enzimática resulta em radicais livres que são tóxicos para bactérias e parasitos. Nitro compostos tem sido utilizados na terapêutica como anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, sedativos/hipnóticos, anticoagulantes, anti-histamínicos H2, antibacterianos e antiparasitários. Nitro compostos tem a habilidade de desestabilizar membranas biológicas e aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio que interagem com biomoléculas (CHUNG et al., 2011).

1.6.1. Compostos nitroheterocíclicos

Os principais produtos gerados por compostos nitroheterocíclicos ($R-NO_2$), responsáveis pela atividade citotóxica, são ânions nitro-radicais ($R-NO_2^{\bullet-}$) e derivados hidroxilaminas ($R-NHOH$). Compostos intermediários formados a partir da redução de nitro compostos podem interagir com resíduos de tiol presentes nas enzimas de microrganismos (CHUNG et al., 2011).

O grupo nitro ($R-NO_2$) de compostos nitroheterociclos ao ser reduzido (Figura 15), recebe dois elétrons e dois prótons, forma um composto intermediário nitroso ($R-NO$), mais dois elétrons e dois prótons são adicionados o que resulta em intermediário hidroxilamina ($R-NHOH$) e a adição de mais dois elétrons resulta na formação de amina (CHUNG et al., 2011).

Figura 15: Processo bio-reductor de nitro compostos.

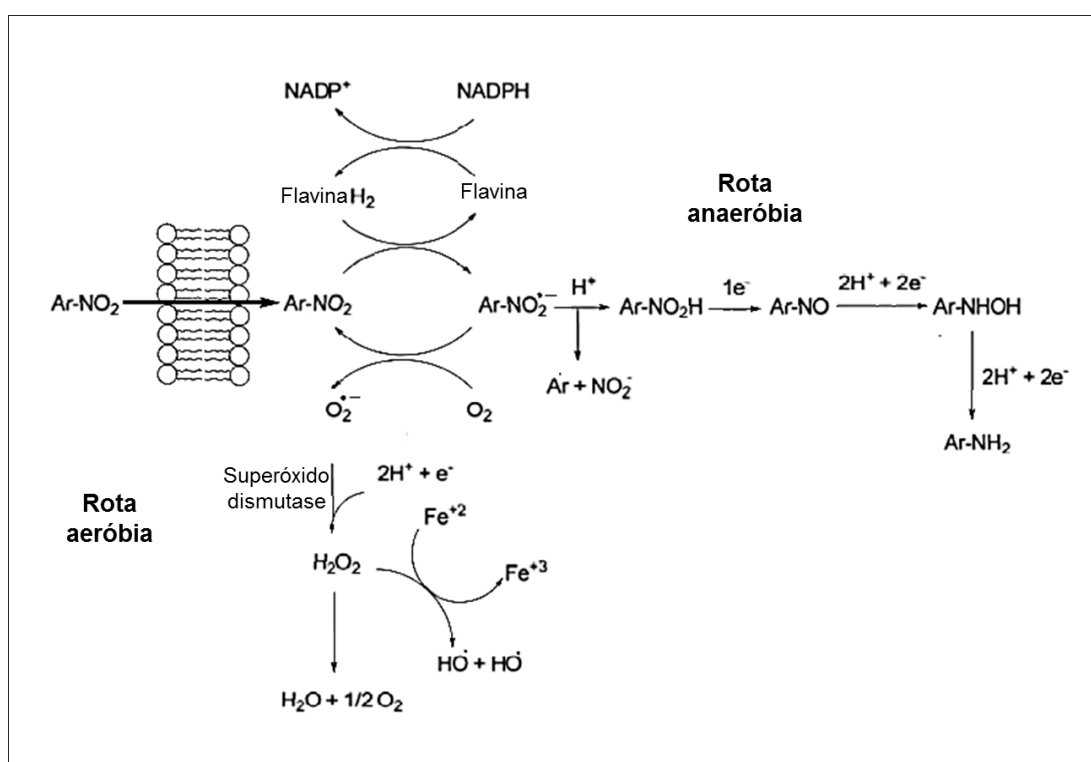


Fonte: Chung et al., 2011.

A redução enzimática de nitro compostos, pode ser em ambiente aeróbico ou anaeróbico, resulta na formação de radical aniônico (Figura 16). Em ambiente aeróbico, o nitro radical

aniônico ao interagir com o oxigênio molecular presente no meio, forma o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que pela ação da enzima superóxido dismutase forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este em presença de Fe^{+3} libera hidroxila ($\bullet OH$) tóxica a microorganismos. Em condição anaeróbia, o grupo nitro, geralmente, é reduzido a derivado amino e os principais metabólitos são radicais aniônicos, derivado nitroso, radical $Ar-NO_2H^{\bullet+}$ e hidroxilamina (CHUNG et al., 2011).

Figura 16: Rotas aeróbia e anaeróbia do metabolismo de nitrocompostos.

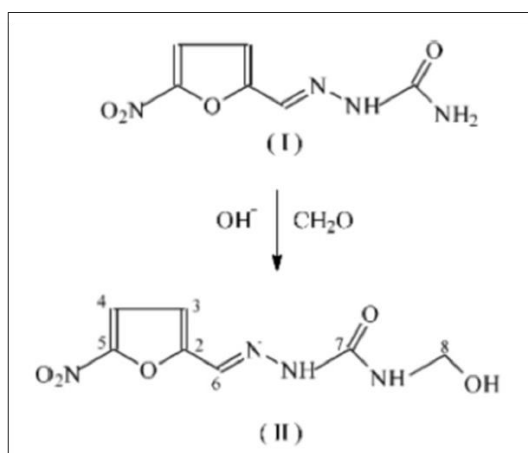


Fonte: Chung et al., 2011.

Compostos nitrofurânicos apresentaram atividade inibitória de tripanotona redutase ao interferir na redução dissulfeto da enzima (BLUMENSTIEL et al., 1999). Hidroximetilnitrofural (Figura 17), derivado de nitrofural, apresentou maior atividade anti *T. cruzi*, formas tripomastigotas e amastigotas, em relação ao nitrofural e benzonidazol (CHUNG et al., 2003). Hidroximetilnitrofural demonstrou afetar a atividade biológica das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, ao inibir o crescimento e interferir no processamento de RNAmensageiro (RNAm) ao diminuir a produção de pequenos

RNAs nucleares (U1, U2 e U4 snRNA), consequentemente altera o *trans-splicing*, reação de esterificação para formação de RNAm de tripanosomas (BARBOSA et al., 2007).

Figura 17: Síntese de hidroximetilnitrofurural. A partir da adição de hidroxila em nitrofurural (I) obtém-se o hidroximetilnitrofurural (II).



Fonte: Chung et al., 2003.

1.6.2. Derivados benzofuroxânicos

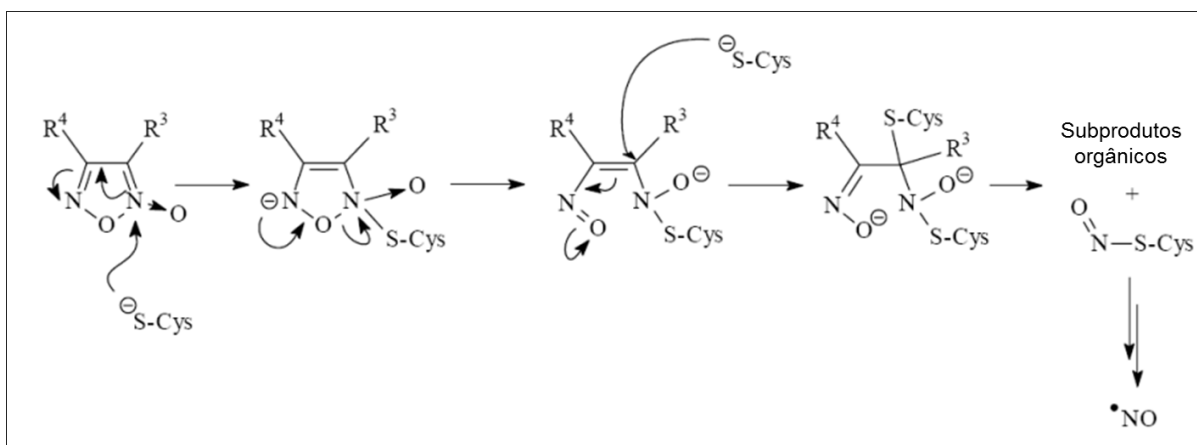
Compostos benzofuroxânicos apresentam atividade anti tumor (FARIAS et al., 2015). bacteriostática e fungistática (CHUGUNOVA et al., 2014) e anti leishmania (DUTRA et al., 2014). Derivados benzofuroxânicos apresentaram também atividade anti *T. cruzi*, para formas epimastigotas (BOIANI et al., 2010; JORGE et al., 2013; BENÍTEZ et al., 2014) e amastigotas, sem ser mutagênico para camundongos *Mus musculus* (BOSQUESI, 2013).

Compostos benzofuroxânicos tem demonstrado ser uma alternativa promissora na busca por moléculas anti-chagásicas, pois são menos tóxicos que benzonidazol e nifurtimox e apresentam um sistema nitroaromático oxidativo de compostos nitroheterocíclicos. A estrutura $=\text{N}(\rightarrow\text{O})\text{O}^-$ presente nos derivados benzofuroxânicos confere as propriedades eletro-aceptoras similares aos compostos nitro-aromáticos ou *N-óxidos* que são utilizados em agentes anti tumoral e/ou citotóxico bioredutores ativados. Tem sido proposto que a citotoxicidade de benzofuroxânicos seja devido à reação com grupo tiol, por isso apresentam potencial atividade inibidora de tripanotona redutase (JORGE et al., 2013). Além da reação de benzofuroxânicos com o grupo tiol (sulfidril, $-\text{SH}$) (ŠARLAUSKAS et al., 2009), a

redução do grupo nitro leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ŠARLAUSKAS et al., 2014). A estrutura *N*-óxido apresentou ser essencial para atividade tripanossomicida em formas epimastigotas de *T. cruzi* (CERECETTO et al., 1999).

Supõe-se que benzofuroxânicos estejam relacionados com a capacidade de doação de óxido nítrico (NO) devido à presença do anel furoxânico; apresentam grupos que retiram elétrons, que é induzido por tiol a liberar NO (JOVENÉ et al., 2013). O ataque de uma molécula de tiol ao nitrogênio *N*-óxido (Figura 18), o átomo de enxofre da cisteína age como nucleófilo, ocasiona a abertura do anel furoxânico e produz um intermediário. Uma segunda molécula de tiol ataca o carbono alfa da sub-unidade *N*-óxido substituído com nitroso, ocorre a formação de subprodutos e tionitrito, precursor de NO (BOSQUESI, 2013; JOVENÉ et al., 2013).

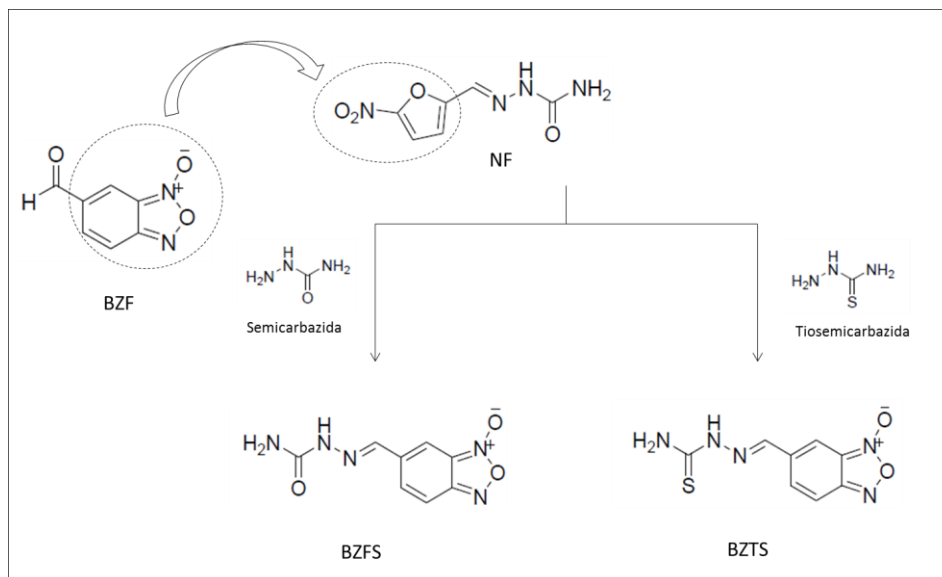
Figura 18: Mecanismo proposto para liberação de NO dependente de tiol por núcleo furoxânico.



Fonte: Bosquesi, 2013.

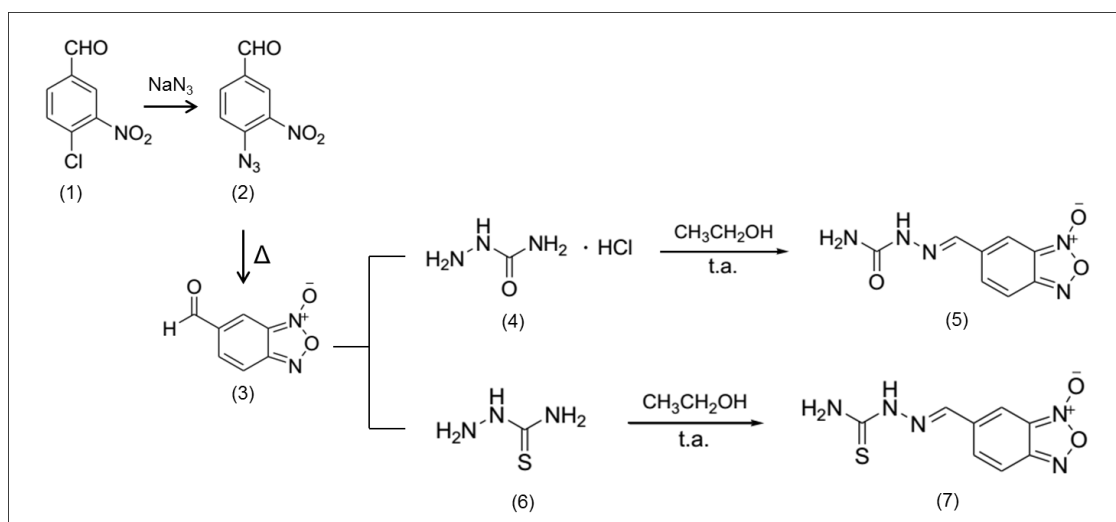
Nifurtimox, derivado nitrofurânico, bem como hidroximetilnitrofural (CHUNG et al., 2003; BARBOSA et al., 2007) e derivados benzofuroxânicos (BOIANI et al., 2010) apresentam atividade anti *T. cruzi*; os benzofuroxânicos podem inibir tripanotiona redutase (JORGE et al., 2013). Bosquesi (2013) sintetizou derivados benzofuroxânicos (Figura 19), compostos benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol-1-*N*-óxido. O anel nitrofurânico, presente no nitrofural, foi substituído por núcleos benzofuroxânicos e foram obtidos isómeros de nitrofural (Figura 20).

Figura 19: Síntese de derivados benzofuroxânicos (BZFS e BZTS) a partir da substituição de nitrofurânico do nitrofural (NF) por benzofuroxânicos (BZF).



Fonte: Modificado de Bosquesi, 2013.

Figura 20 : Reações da síntese de derivados benzofuroxânicos. (1) 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (2) 4-azido-3-nitrobenzaldeído (3) 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (4) semicarbazida (5) 6-((metil)benzo[c](2-carbamoylidrazona)-1-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (6) tiosemicarbazida (7) 6-((metil)benzo[c](2-carbamotolidrazona)-1-N-óxido-1,2,5-oxadiazol.(t.a.) temperatura ambiente.

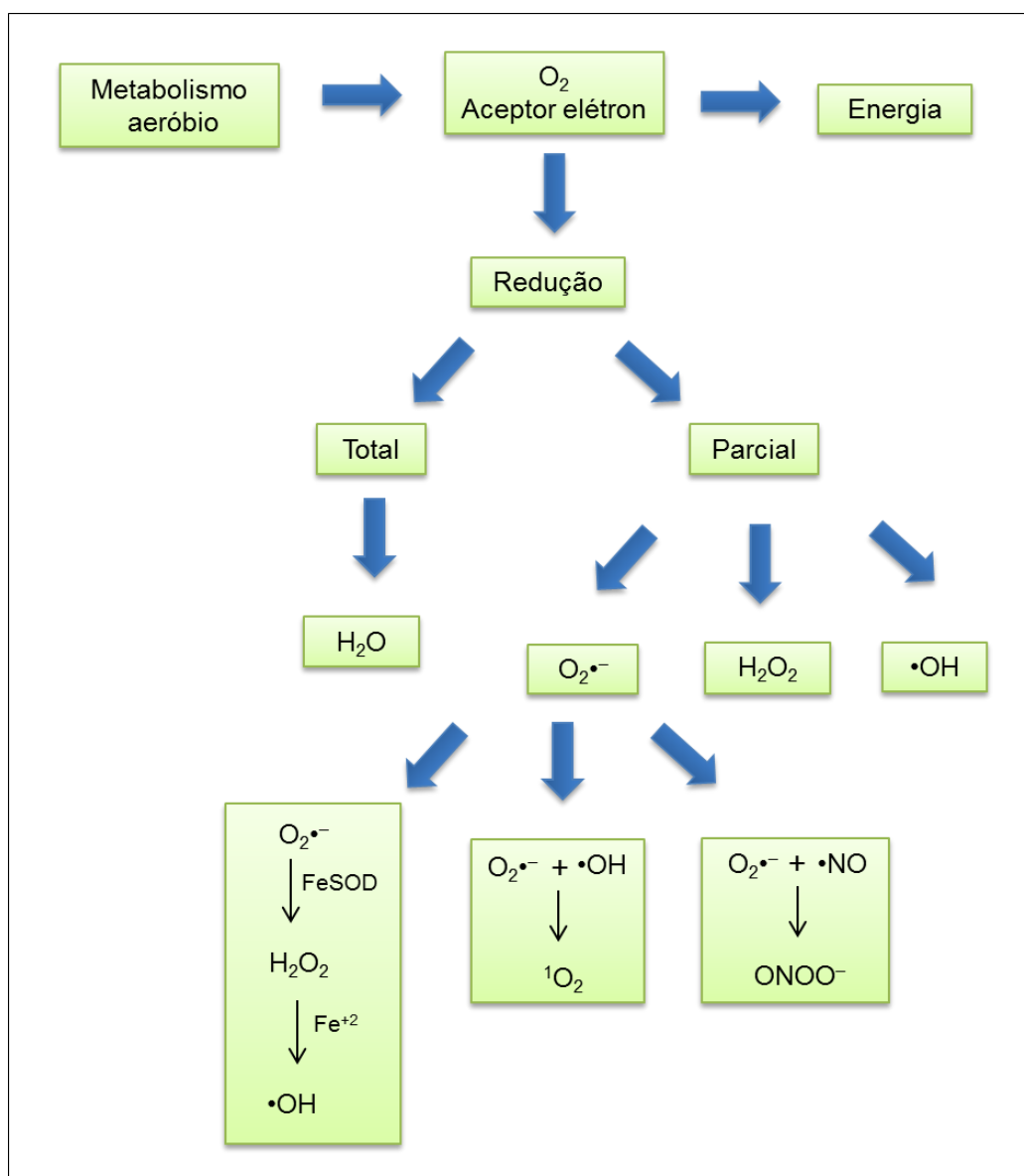


Fonte: Modificado de Bosquesi, 2013.

1.7. Metabolismo oxidativo

Organismos aeróbios utilizam oxigênio molecular (O_2), como o aceptor de elétron na produção de energia por processos oxidativos, que é reduzido a água (Figura 21). Esse oxigênio molecular pode ser parcialmente reduzido a espécies relativamente estáveis ao receber um, dois ou três elétrons, com a formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), respectivamente. Apesar de $O_2^{\bullet-}$ não ser muito reativo, é o precursor de H_2O_2 e outros dois fortes oxidantes, peróxinitrito ($ONOO^-$) e $HO\bullet$ (TURRENS, 2004).

Figura 21: Via oxidativa aeróbia, redução do oxigênio e produção de EROs e ERNs.



Fonte: Autor.

A via aeróbia é um processo oxidativo no qual são produzidas moléculas com átomos de oxigênio (EROs: espécies reativas de oxigênio) ou nitrogênio (ERNs: espécies reativas de nitrogênio) com elétron desemparelhado (BARREIROS et al., 2006). Estresse oxidativo é a situação na qual ocorre o desbalanço entre oxidantes e antioxidantes. A principal fonte de estresse oxidativo em células vivas são as EROs, moléculas derivadas de oxigênio, altamente reativas com as biomoléculas (AGUIAR et al., 2013).

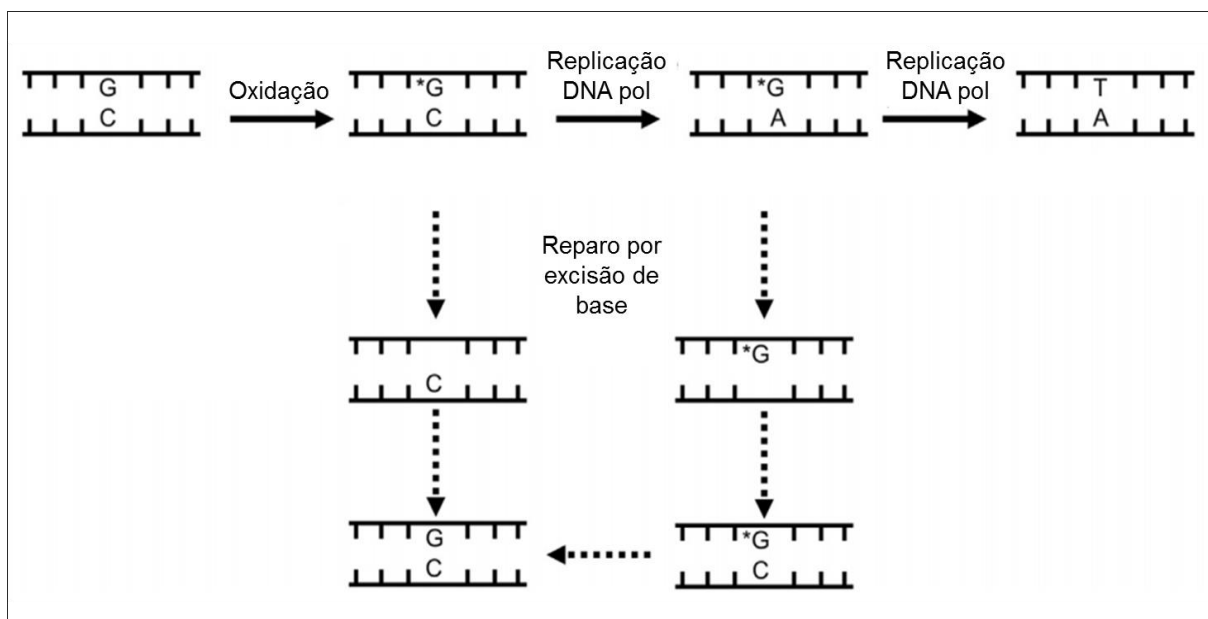
O radical $\bullet\text{OH}$ é o mais deletério, pois apresenta meia-vida muito curta e alta reatividade, ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Pode ser formado pela reação de H_2O_2 com metais de transição. O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, proteínas e membranas celulares. No DNA, ataca as bases nitrogenadas e a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. A eletrofilicidade do $\bullet\text{OH}$ possibilita a sua interação com as bases nitrogenadas por adição às insaturações em sítios de alta densidade eletrônica, por isso pode reagir com as bases púricas e pirimidínicas. Nos aminoácidos e proteínas, $\bullet\text{OH}$ pode reagir com a cadeia lateral, preferencialmente de cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar clivagens de ligações com ou sem fragmentos e ligações cruzadas, a consequência pode ser a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo por meio de membranas celulares, citólise e morte celular. O ataque ocorre por adição do radical $\text{HO}\bullet$ ou por abstração de hidrogênio do carbono $\text{C}\alpha\text{--COO}^-$ ligado ao carboxilato e grupo amino. O radical $\bullet\text{OH}$ pode atacar lipídios de membranas celulares em sítios suscetíveis, como o grupo metilênico alílico, converte-o em novo centro de radical livre. O carbono radicalar adiciona oxigênio e gera o radical lipídio-peroxila, que pode facilmente atacar as proteínas nas membranas. O ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode reagir com $\bullet\text{OH}$ e produzir oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), bem como com $\bullet\text{NO}$ e produzir ONOO^- (BARREIROS et al., 2006).

A principal consequência do estresse oxidativo é o dano ao DNA, no qual resulta na instabilidade genômica. Guanina (G) é a base mais suscetível à oxidação, devido ao seu baixo potencial redutor. O produto principal da oxidação da G é a formação de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG). A correlação entre a produção de EROs e a formação de 8-oxoG é um bom biomarcador celular para indicar o estresse oxidativo. 8-oxoG ao assumir a conformação *syn* é mutagênica, dada a forte habilidade funcional de mimetizar timina. Se não for reparada, 8-oxoG pode parear com adenina e causar uma transversão de G:C para T:A. Na duplicação

do DNA, 8-oxoG ao ser inserida pode gerar duplas quebras o que torna essa lesão deletéria (AGUIAR et al., 2013).

A reação de EROs com as bases nitrogenadas e o esqueleto de açúcar e fosfato da cadeia de DNA produzem quebras simples ou duplas na cadeia, modificações nas bases, sítios apurínicos/apirimidínicos e ligações de DNA-proteínas. Duplas quebras são letais se deixadas não pareadas, pois as bases oxidadas podem ser mutagênicas, citotóxicas ou ambas. Duplas quebras no DNA são reparadas por recombinação não homóloga e homóloga. Bases modificadas são primeiramente removidas por DNA glicosilases, o que produz no local sítios sem bases (Figura 22) que são removidos por reparo de excisão de base (MACHADO-SILVA et al., 2016).

Figura 22: Reparo na lesão de 8-oxoguanina no DNA. Na replicação do DNA, se for utilizado 8-oxoG será incorporado A na cadeia oposta pela DNA polimerase, o pareamento errado resultante produz mutação por transverso C:G para A:T. O reparo no DNA pode ser por excisão de base para remover 8-oxoG.



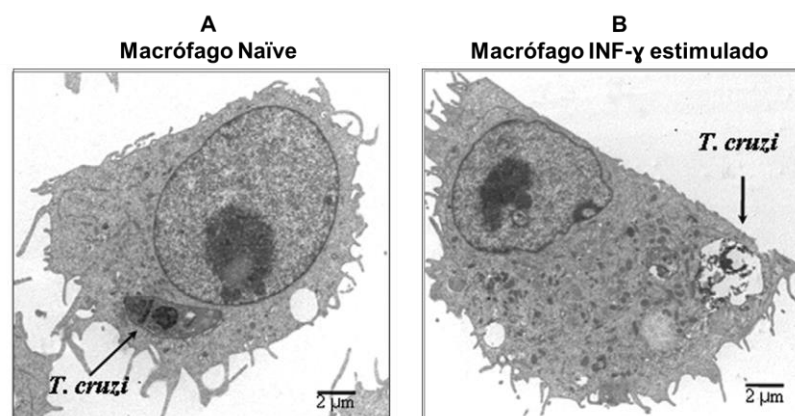
Fonte: Modificado de Machado-Silva et al., 2016.

T. cruzi precisa sobreviver ao microambiente altamente oxidativo produzido pelo macrófago, para se reproduzir e disseminar para outros macrófagos e outras células (células do músculo liso e estriado e fibroblastos) e estabelecer a infecção. Por isso mecanismos antioxidativos são de extrema importância para *T. cruzi* (PIACENZA et al., 2009b).

Macrófagos Naïve (não estimulados por citocinas), produzidos pelo sistema imune inato do hospedeiro, ao internalizarem os tripomastigotas no vacúolo fagossomal (Figura 23A), ativam NADPH oxidase (NADPHox), associada na membrana, que ao ativar um complexo de flavoenzima leva a formação de grande quantidade do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O radical $O_2^{\bullet-}$ dismuta a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ação de superóxidos dismutases. Íons com metal de transição em presença de H_2O_2 geram o radical hidroxila ($\bullet OH$), um oxidante altamente reativo e sem especificidade (PIACENZA et al., 2009b).

No início da infecção, as células *natural killer* (NK) produzem citocinas pró-inflamatórias, interferon gama ($INF-\gamma$), que estimulam os macrófagos a ativarem óxido nítrico sintase que gera óxido nítrico ($\bullet NO$), produzido no citoplasma do macrófago que ao entrar no fagossomo reage com $O_2^{\bullet-}$ e produz peróxinitrito ($ONOO^-$), poderoso oxidante e citotóxico que atua contra patógenos (Figura 23B). Peróxinitrito também aumenta a produção de $\bullet OH$, dióxido de nitrogênio ($\bullet NO_2$) e carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), radicais que oxidam DNA e lipídios e participam da oxidação e nitratação de proteínas (PIACENZA et al., 2009b). Peróxinitrito reage diretamente por meio de reações de oxidação a moléculas que contenham tiol. As reações de oxidação de dois elétrons do $ONOO^-$ com tióis de baixo peso molecular, RSH e $T(SH)_2$, geram os derivados sulfênicos ($R-SOH$) e dissulfetos ($R-SS-R$, TS_2), respectivamente (PIACENZA et al., 2012).

Figura 23: Lise de *T. cruzi* dependente de peroxinitrito. Foto de microscopia eletrônica de macrófagos naïve e $INF-\gamma$ estimulado após 2 horas de infecção. (A): Ultra estrutura de macrófago naïve infectado pela forma tripomastigota de *T. cruzi*. (B): As zonas densas, indicada pela seta, mostram a lise celular de *T. cruzi* devido ao alto poder citotóxico do peroxinitrito produzido pelo macrófago estimulado por $INF-\gamma$.



Fonte: Modificado de Piacenza et al., 2009b.

1.8. Mitocôndria de Tripanosomas

A mitocôndria é uma organela responsável pela produção de energia para a sobrevivência da célula, crescimento e diferenciação, homeostase de cálcio, balanço redutor, resposta ao estresse oxidativo e morte celular. A compartimentalização da mitocôndria em membranas internas e externas, espaço intermembranas e matriz propicia um microambiente otimizado para processos de biossínteses e catabólicos. A mitocôndria apresenta papel central na regulação de morte celular programada, alterações no volume da mitocôndria e despolarização da membrana conduzem a sinais de apoptose, como ativação proteolítica de caspases. A mitocôndria é a maior fonte de EROs, mesmo sob condições normais de fisiologia, como sinalização celular e proliferação, ou que indicam citotoxicidade. O principal local que gera EROs é a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Por isso moléculas antioxidantes mitocondriais são importantes para manter a homeostase de EROs que não sejam letais (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

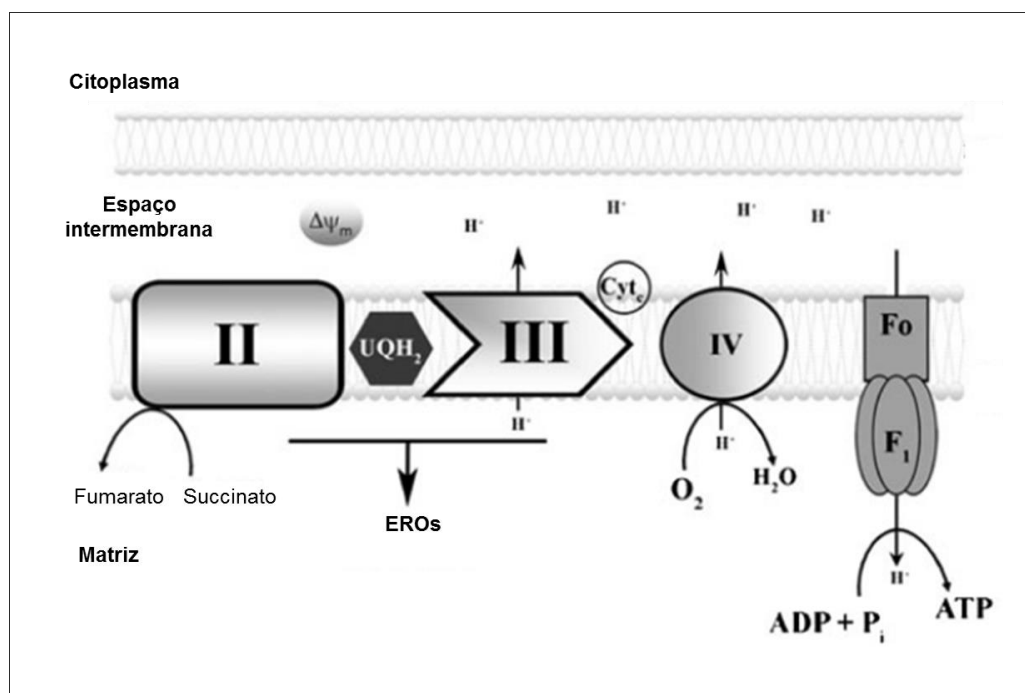
1.8.1. Cadeia respiratória

Na oxidação da glicose na glicólise ocorre a formação de piruvato que é transportado para a matriz mitocondrial e fornece NADH, produzido também no ciclo do ácido tricarboxílico, na matriz mitocondrial. O ciclo do ácido tricarboxílico além de NADH produz succinato. NADH e succinato são substratos ricos em elétrons para serem oxidados pela cadeia respiratória do complexo II. No complexo II ocorre a oxidação de succinato a fumarato por ubiquinona oxidoredutase, processo sem a translocação de próton através da membrana como ocorre nos outros complexos da cadeia respiratória. Ubiquinona (UQ), pequena molécula orgânica lipossolúvel, que difunde dentro da membrana mitocondrial interna (Figura 24). A forma reduzida de ubiquinona, ubiquinol (UQH₂) difunde para o complexo III, ou seja, transfere elétrons do complexo II para o III. No complexo III, UQH₂ é oxidado a UQ, prótons são liberados para o espaço intermembranas mitocondrial e os elétrons são transferidos para a redução do citocromo c redutase, localizado na membrana mitocondrial interna. O citocromo c transfere elétrons do complexo III para o IV. No complexo IV, o citocromo c oxidase transfere elétrons para O₂ que é reduzido a H₂O. Esse processo requer a captação de próton da matriz, bem como o gradiente de prótons formados são liberados para o espaço mitocondrial

intermembranas. Esse processo de transferência de elétrons fornece a energia para a produção de ATP na matriz, a partir de ADP e fosfato (RICH; MARÉCHAL, 2010). O complexo I apresenta função limitada (GONÇALVES et al., 2011), não há consenso se apresenta atividade NADH desidrogenase (TOMÁS; CASTRO, 2013).

A síntese aeróbia de ATP por via da fosforilação oxidativa forma, a partir oxigênio parcialmente reduzido, o radical $O_2^{\bullet-}$ que é dismutado a H_2O_2 por superóxido dismutase (GONÇALVES et al., 2011). A maior produção de $O_2^{\bullet-}$ ocorre no complexo III (TOMÁS; CASTRO, 2013).

Figura 24: Cadeia respiratória em *T. cruzi*. A oxidação de succinato a fumarato produz elétrons que são carregados por ubiquinol (UQH_2), transfere elétrons do complexo II ao III. No complexo III, UQH_2 é oxidado a ubiquinona (UQ), o que produz elétrons transportados por citocromo c ao complexo IV. Os elétrons são utilizados na redução de O_2 , processo em que ocorre a produção de H_2O . A eletrotransferência através dos complexos III e IV está acoplada a translocação de próton (H^+) da matriz para o espaço intermembranas mitocondrial, o que gera o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). O gradiente eletroquímico de próton (H^+) é utilizado para a produção de ATP a partir de ADP e P_i . Os processos de eletrotransferência que envolvem o complexo II e III e os carreadores ubiquinol e citocromo c redutase são os principais formadores de EROs.



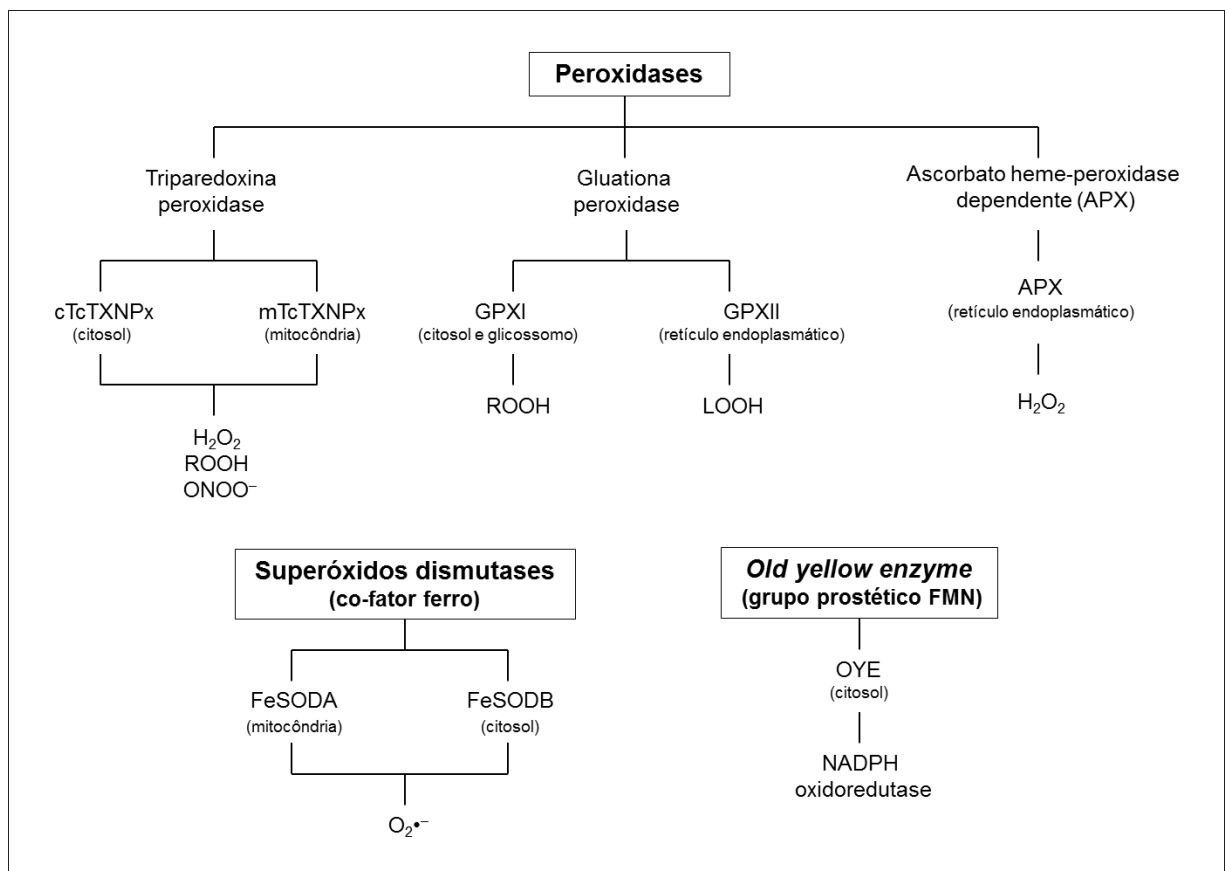
Fonte: Modificado de Gonçalves et al., 2011.

1.9. Proteínas do metabolismo oxidativo e alvos moleculares

Ao contrário dos hospedeiros mamíferos, tripanosomatídeos apresentam metabolismo redutor baseado em tiol, que são dependentes de tripanotiona ditiol, mantida em seu estado reduzido $[T(SH)_2]$, a partir do estado oxidado (TS_2) pela tripanotiona redutase (TR). $T(SH)_2$ atua como doador de elétron para triparedoxina peroxidase (TXNPx) para que esta possa exercer a atividade peroxidase (IRIGOÍN et al., 2008; GRETES et al., 2012). Os sistemas detoxificadores enzimáticos baseados na via da tripanotiona ditiol e triparedoxina recebem elétrons a partir da doação de NADPH (derivado da via pentose fosfato). No citosol, tripanotiona $[T(SH)_2]$ é sintetizada por tripanotiona sintetase (TS) a partir de duas moléculas de glutatona (GSH) que são covalentemente ligadas a espermidina (PIACENZA et al., 2012).

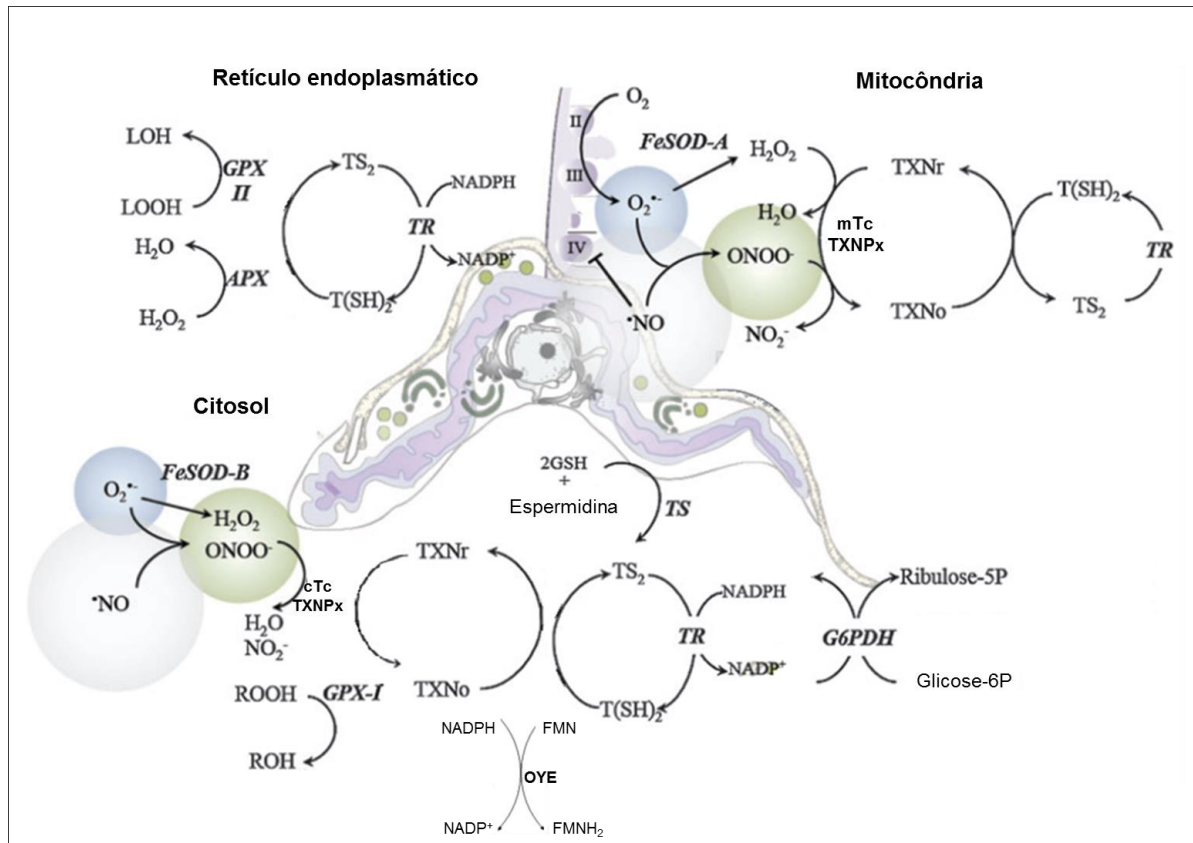
Com isso é formado o sistema constituído por tiol peroxidases (Figura 25) que contém oxidoredutases da superfamília tioredoxina: triparedoxina peroxidase (TXNPx), reduzida por triparedoxina (TXN), que por sua vez é mantida no estado reduzido por tripanotiona ($T(SH)_2$), mantida no estado reduzido por tripanotiona redutase (TR) que é reduzida por NADPH (TOMÁS; CASTRO, 2013).

Em *T. cruzi* (Figuras 26 e 27) foram descritas cinco peroxidases (duas glutatona peroxidases, duas triparedoxinas peroxidases e uma ascorbato heme-peroxidase dependente) que diferem na localização subcelular e substrato específico. Glutatona peroxidase-I (GPXI), localizada no citosol e glicossomo, atua em hidroperóxidos ($ROOH$), enquanto que glutatona peroxidase-II (GPXII), no retículo endoplasmático, atua em hidroperóxidos de lipídio ($LOOH$). Triparedoxina peroxidase citosólica (cTcTXNPx) e mitocondrial (mTcTXNPx) utilizam triparedoxina (TXN) como substrato redutor, para que possam detoxificar $ONOO^-$, H_2O_2 e pequenas cadeias orgânicas de hidroperóxidos. Ascorbato heme-peroxidase dependente (APX), no retículo endoplasmático, converte o H_2O_2 em H_2O (PIACENZA et al., 2012)

Figura 26: Enzimas dos processos antioxidativos em *T. cruzi*.

Fonte: Autor.

Figura 27: Distribuição subcelular em *T. cruzi* (citól, mitocôndria e retículo endoplasmático) de enzimas do sistema antioxidante. O doador de elétron para o sistema enzimático é NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), derivado da via pentose fosfato. Na mitocôndria, a cadeia transportadora de elétrons é o principal local de formação de $O_2^{\bullet-}$ (esfera azul), principalmente no complexo III (CIII). A respiração mitocondrial é interrompida pelo $\bullet NO$ (esfera cinza), produzido pelo hospedeiro, que inibe citocromo c oxidase do complexo IV (CIV) do parasito. Consequentemente, citocromo c redutase do CIII aumenta a produção de $O_2^{\bullet-}$, e este contribui para a formação de $ONOO^-$ (esfera verde). O tamanho das esferas de $\bullet NO$, $ONOO^-$ e $O_2^{\bullet-}$ ilustram a capacidade difusional desses oxidantes.



Fonte: Modificado de Yamaguchi et al., 2011; Piacenza et al., 2012.

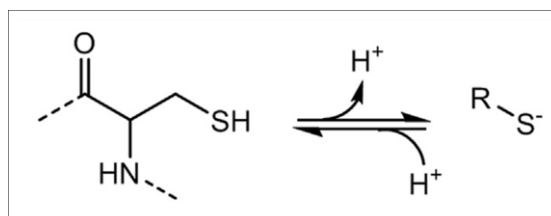
Além das peroxidases, existem quatro superóxidos dismutases que contém ferro como co-fator metálico (FeSOD). Realizam a dismutação do ânion $O_2^{\bullet-}$ para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Localizam-se na mitocôndria (FeSODA), no citosol (FeSODB) e glicossomo (MATEO et al., 2008). No citosol está presente também *old yellow enzyme* (OYE), pertencente à família das flavoenzimas (WILLIAMS; BRUCE, 2002). Apresenta atividade NADPH oxidoreductase, contém flavina mononucleotídeo (FMN) como grupo prostético (MURTA et al., 2006), que reduz substâncias tripanossomicidas (KUBATA et al., 2002; UCHIYAMA et al., 2005). NADPH reduz FMN a $FMNH_2$ para a enzima exercer sua função redutora (YAMAGUCHI et al., 2011).

A identificação de genes que são expressos de modo diferencial em populações de *T. cruzi* suscetível ou resistente ao benzonidazol (MURTA et al., 2008) poderia auxiliar na busca por alvos e no desenvolvimento de fármacos mais específicos (TURRENS, 2004; PIACENZA et al., 2013). Estudos com cepas resistentes relataram elevação no nível de expressão de algumas proteínas antioxidativas em cepas resistentes, quando tratadas com benzonidazol como triparedoxina peroxidase (ANDRADE et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2009; KOHATSU, 2013). Observou-se aumento da expressão desta enzima em diferentes cepas tratadas com benzonidazol; outras enzimas também aumentam sua expressão, tais como: *old yellow enzyme* (MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008), superóxido dismutase (NOGUEIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008), calpaína, cisteína peptidase, tirosina aminotransferase, glutamato desidrogenase e nucleosídeo difosfato quinase (ANDRADE et al., 2008).

1.9.1. Triparedoxina peroxidase (peroxiredoxina)

Cisteína (Cys) é um resíduo de aminoácido altamente conservado nos locais funcionais em proteínas, com atividades regulatórias, catalíticas e de ligação. Cys apresenta o átomo de enxofre na forma de grupo tiol (sulfidrila), reativo com eletrófilos e agentes oxidantes, além de ter alta afinidade por metais. O tiol ($R-SH$), ao ionizar, gera o tiolato ($R-S^-$), formas protonada e desprotonada do resíduo Cys (Figura 28), respectivamente (POOLE, 2015).

Figura 28: Forma protonada e desprotonada do resíduo de cisteína. A desprotonação do grupo tiol ($R-SH$) gera a forma carregada de tiolato ($R-S^-$). As linhas tracejadas representam as ligações peptídicas de resíduos próximos.

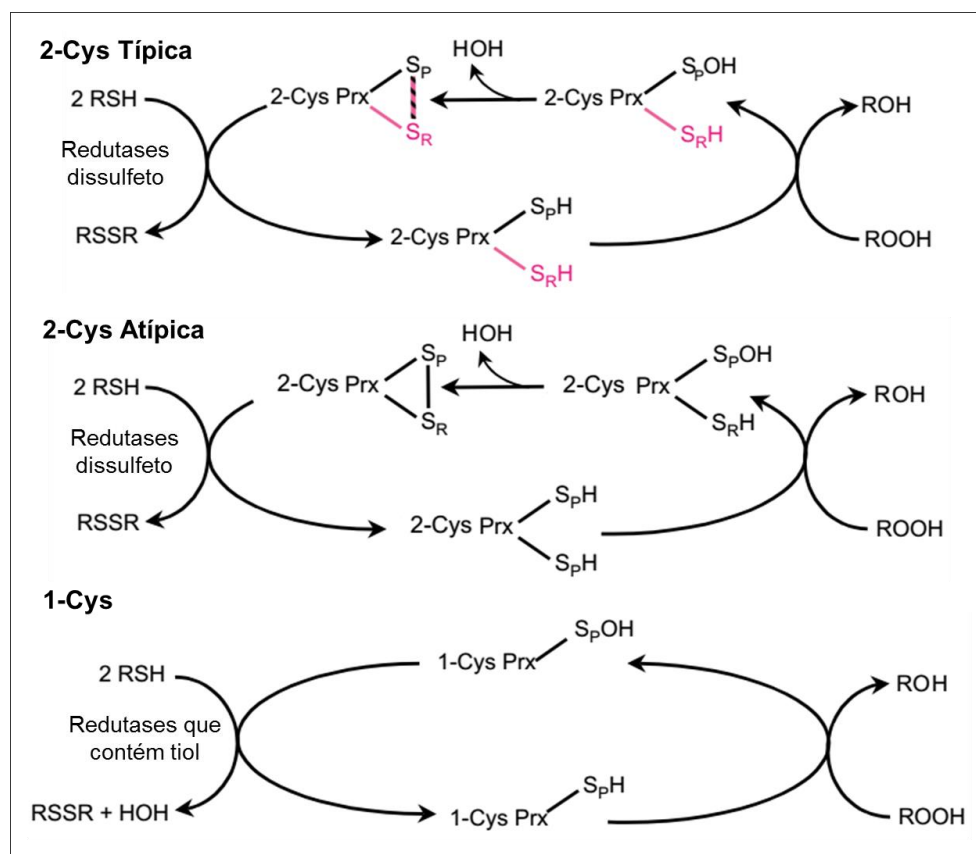


Fonte: Modificado de Poole, 2015.

Peroxiredoxinas ou triparedoxina peroxidase (TXNPx) tem em comum o resíduo de cisteína conservado, a cisteína peroxidática (C_p) que reduz peróxidos. Seguida a oxidação da

C_p pelo substrato, um segundo tiol livre, cisteína resolução (C_R), forma uma ligação dissulfeto com C_p (Figura 29). A diferença entre as peroxiredoxinas (1-Cys e 2-Cys) é a quantidade de resíduos de cisteínas envolvidos nas catálises, ou seja, quem fornece C_R , provém de outra molécula (1-Cys) ou de outra peroxiredoxina (2-Cys). 2-Cys pode ser dividida em típica 2-Cys e atípica 2-Cys, diferem na formação da ligação dissulfeto. Na típica 2-Cys a ligação dissulfeto ocorre entre C_p de uma cadeia com C_R da outra cadeia, formação de ligação dissulfeto intermolecular. No caso da atípica 2-Cys, C_R se encontra na mesma molécula, formação de ligação dissulfeto intramolecular (PIÑEYRO et al. 2005; HALL et al., 2009).

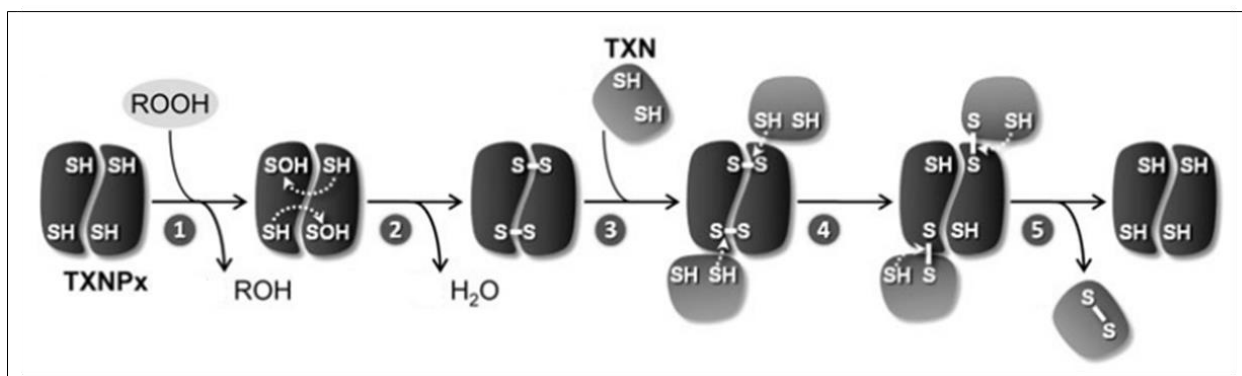
Figura 29: Mecanismo da reação catalítica de TXNPx (Prx). Para as três classes de Cys, no primeiro passo da reação, a cisteína peroxidática (S_pH) é oxidada a ácido sulfênico (S_pOH) ao atacar o substrato peróxido ($ROOH$). No segundo passo da reação, no caso da 2-Cys típica, a cisteína resolução (S_RH), localizada no C terminal de outra subunidade, ataca o ácido sulfênico da cisteína peroxidática (S_pOH) de uma subunidade. Essa reação de condensação resulta na formação de estável ligação dissulfeto (S_p , em preto e S_R , em vermelho) intersubunidades (barra em preto e vermelho). Para a 2-Cys atípica, a cisteína peroxidática e a resolução estão no mesmo polipeptídeo, a ligação dissulfeto é intramolecular. No caso de 2-Cys, são mantidas no estado reduzido por redutase flavoproteína dissulfeto e redutase ditio (2 RSH) que é oxidada a dissulfeto (RSSH). No caso de 1-Cys, a ligação dissulfeto entre as cisteínas (S_p e S_R) é intramolecular, e são mantidas no estado reduzido por tióis de baixo peso molecular.



Fonte: Modificado de Wood et al., 2003.

TXNPx é membro da ubíqua família peroxiredoxina, uma peroxidase que utiliza triparedoxina, membro da superfamília tioredoxina, como fonte doadora de elétron (Figura 30), proveniente do resíduo de cisteína, para remover peróxidos (CASTRO; TOMÁS, 2008). O ciclo catalítico de TXNPx pode ser dividido em: peroxidação, resolução e regeneração (HALL et al., 2009).

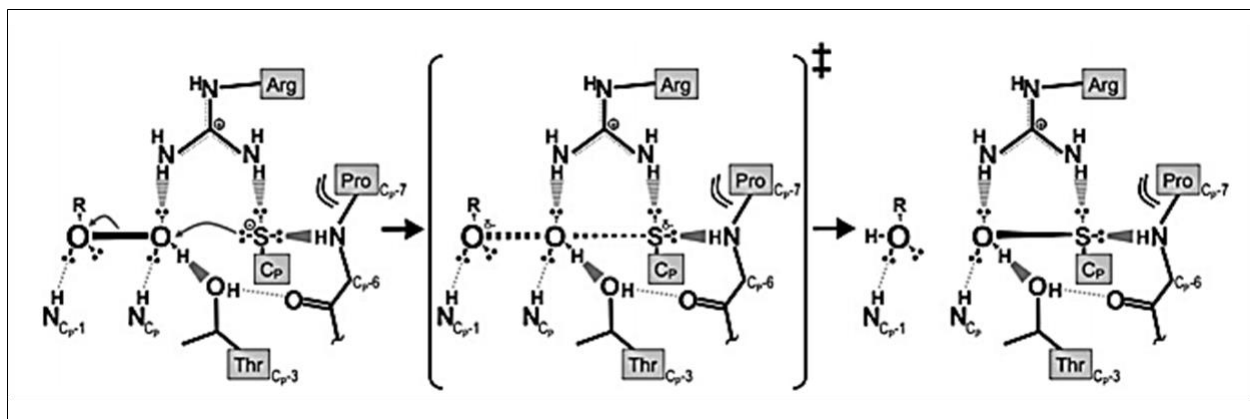
Figura 30: Mecanismo catalítico de TXNPx (2-Cys típica). 1: Cisteína peroxidática (C_p) do dímero de triparedoxina peroxidase (TXNPx) reage com ROOH e produz ROH (álcool) e $-SOH$ (ácido sulfênico). 2: Ocorre a formação da ligação ponte dissulfeto ($S-S$) intermolecular entre TXNPx, reações entre Cys oxidada ($-SOH$) e o grupo tiol distal ($-SH$), com concomitante liberação de água. 3: A ligação dissulfeto é atacada por uma Cys do grupo tiol de triparedoxina (TXN). 4: Um intermediário catalítico é gerado, no qual C_p é restaurado a sua forma reduzida ($-SH$) e cisteína resolução (C_R) é covalentemente ligada a TXN através de ligação $S-S$. 5: O ciclo da reação é completada por uma mudança na reação tiol-dissulfeto, na qual a ligação dissulfeto mista é resoluciona por um segundo resíduo Cys de TXN, o que libera TXNPx reduzida e o substrato redutor na forma oxidada $S-S$.



Fonte: Modificado de Tomás; Castro, 2013.

TXNPx catalisa a redução direta de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos (ROOH) aos seus correspondentes água (H_2O) ou álcool (ROH), respectivamente. A reação ocorre através do átomo de enxofre da cisteína ativa, presente em TXNPx, que realiza ataque nucleofílico ao átomo de oxigênio distal do peróxido (Figura 31). A reação procede através de um estado de transição planar, com a liberação de álcool e a cisteína de TXNPx oxidada a ácido sulfênico (GRETES et al., 2012).

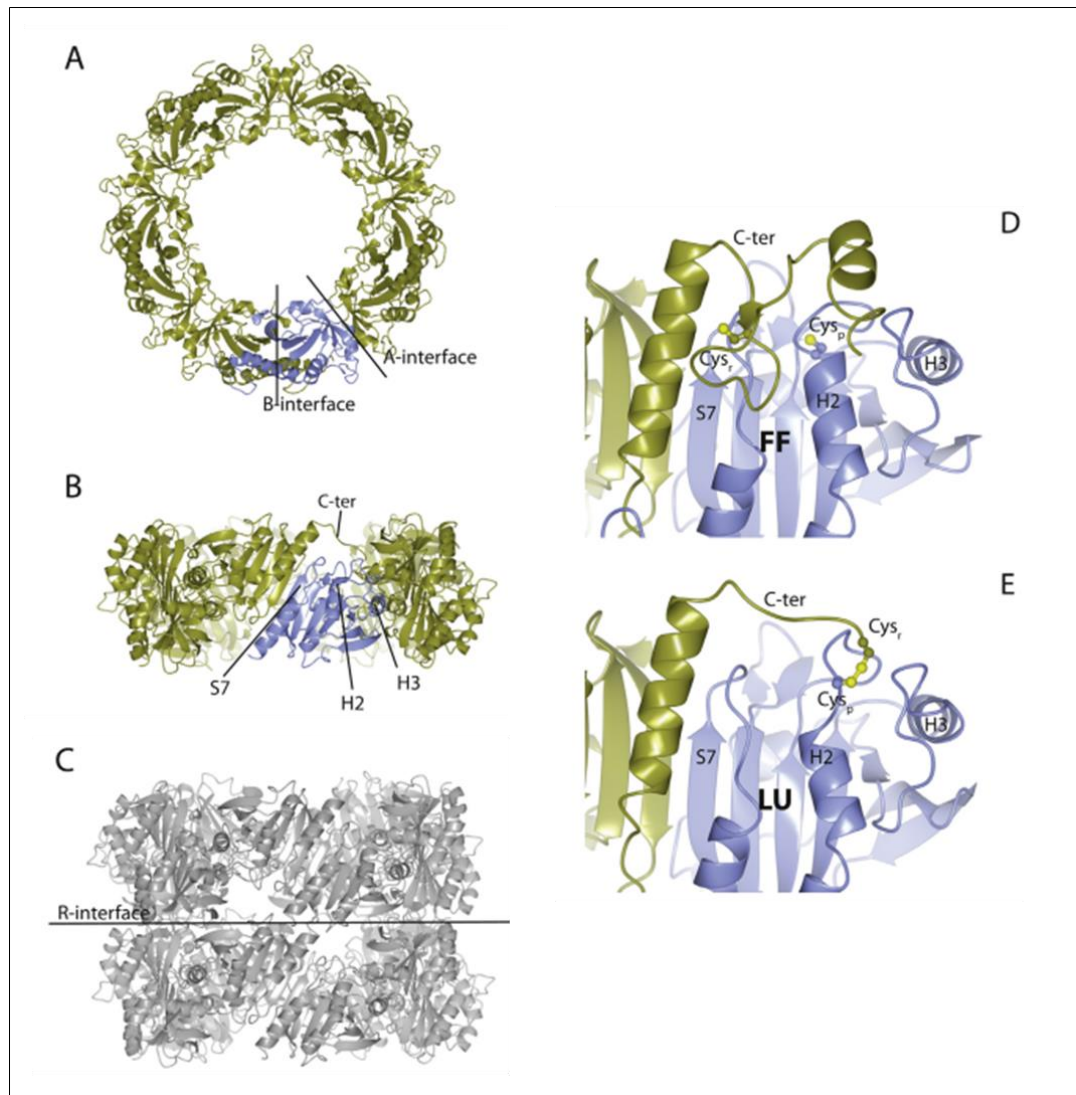
Figura 31: Reação de peroxidação realizada por TXNPx. Ataque nucleofílico do átomo de enxofre da cisteína ao átomo de oxigênio do peróxido. A reação libera álcool e produz cisteína oxidada de TXNPx a ácido sulfênico.



Fonte: Gretes et al., 2012.

As subunidades de TXNPx (2-Cys típica) juntam-se hierarquicamente em estruturas quaternárias organizadas. O primeiro nível de organização é o homodímero simétrico. As subunidades constituem homodímeros que são arranjadas via uma interface isóloga, denominada interface B, formada por dobra- β 7 (S7) e hélices- α 2 (H2) e α 3 (H3). As subunidades constituintes dos homodímeros são invertidas e arranjadas em interface isólogas, essa estrutura confere uma simetria aos dímeros com os dois sítios ativos próximos um do outro. Cada sítio ativo contém a cisteína peroxidática em uma subunidade e a cisteína resolução da subunidade parceira. A cisteína peroxidática encontra-se na região N-terminal da hélice- α e a cisteína resolução está próxima do C-terminal da cadeia polipeptídica. A próxima organização estrutural é o anel, constituído por cinco homodímeros idênticos (Figuras 32A, 32B), em contato um com outra via interface isóloga A, constituída principalmente por hélices- α 3 (H3). O anel é simétrico devido à simetria dos homodímeros constituintes. Em condições de forte oxidação ou ácidas, o anel pode formar agregados de dois ou mais anéis sobrepostos em cima um do outro, denominados nanotubos ou nanopartículas (Figura 32C). No estado reduzido, as subunidades estão na conformação totalmente dobrada (Figura 32D). No estado oxidado da cisteína peroxidática, a hélice- α 2 é parcialmente desdobrada o que leva a conformação local desdobrada, o que permite a cisteína resolução da subunidade parceira formar a ligação dissulfeto com a cisteína peroxidática entre as subunidades (Figura 32E). A dissociação do anel a dímeros é possível, pois a ligação dissulfeto é reduzida por tioredoxina (ANGELUCCI et al., 2016).

Figura 32: Estruturas de 2-Cys típica TXNPx de parasitos eucariotos. (Painel A): Representação da estrutura decamérica reduzida (anel em vista superior) de *Schistosoma mansoni* (PDB: 3zt1). Um dos monômeros está em azul, os outros estão em dourado. Interface inter dímero (interface A) e interface intra dímero (interface B). (Painel B): Vista sagital da mesma estrutura rotacionada em 90°. Interface B, formada por dobra- β 7 (S7) e hélices α 2 (H2) e α 3 (H3). (Painel C): Estrutura em nanotubo (PDB: 3zvj) em pH de condição ácida. Interface inter anel (interface R). (Painel D): Sítio ativo de TXNPx reduzida na estrutura na forma totalmente dobrada (FF) de *Leishmania major* (PDB: 4kif). Cisteínas peroxidática (Cys_p) e resolução (Cys_r) são representadas por bolas e bastões. (Painel E): Sítio ativo de TXNPx oxidado na forma local desdobrada (LU) de *L. brasiliensis* (PDB: 4kb3). C-terminal de um dos monômeros da hélice- α 2 (H2) desdobra para a formação da ligação dissulfeto entre Cys_p e Cys_r.

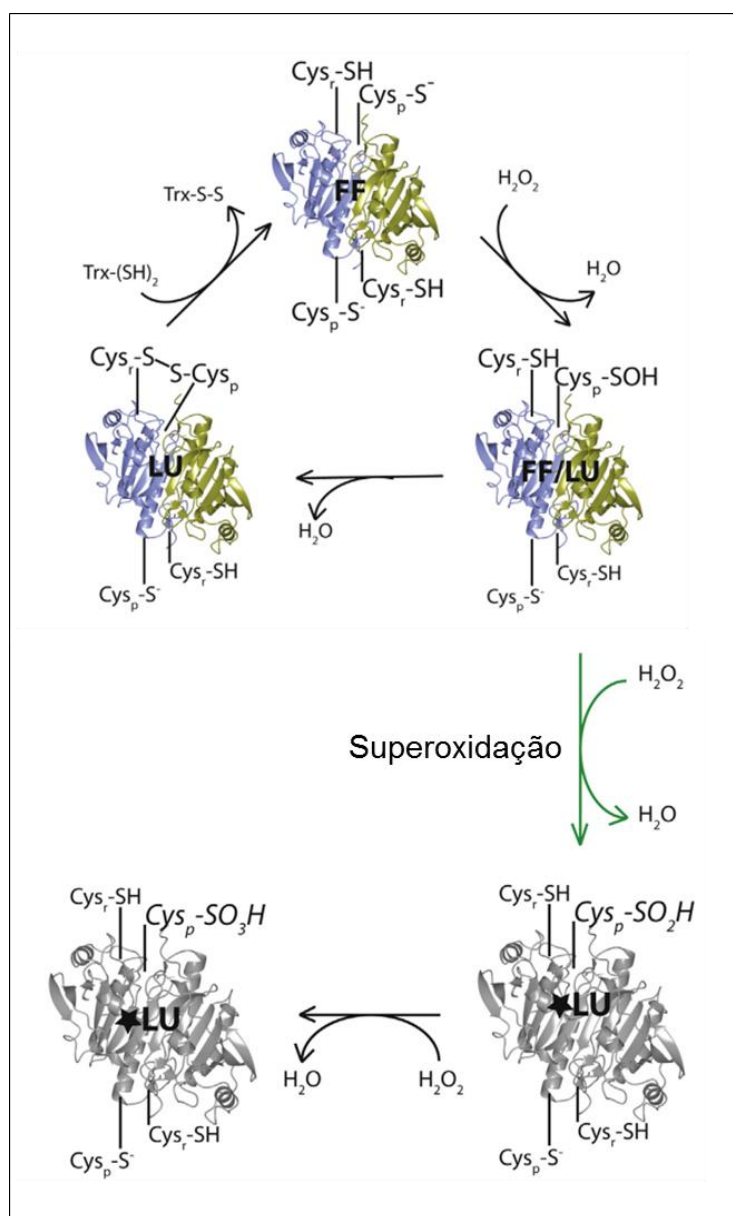


Fonte: Modificado de Angelucci et al., 2016.

Durante a atividade peroxidase de TXNPx, o peróxido (hidroperóxidos orgânicos ou peróxinitrito) reage com o átomo de enxofre da cisteína peroxidática e ocorre a formação de ácido sulfênico. O ácido sulfênico pode seguir duas condições de reações, oxidações posteriores ou redução (Figura 33). O ácido sulfênico pode ser oxidado a ácido sulfinico, e se

houver condição de superoxidação, a cisteína peroxidática é oxidada a forma irreversível, ou seja, o ácido sulfínico é oxidado a ácido sulfônico. O ácido sulfênico ao invés de ser oxidado, pode ser reduzido por cisteína resolução, com a concomitante formação de ligação dissulfeto (ANGELUCCI et al., 2016).

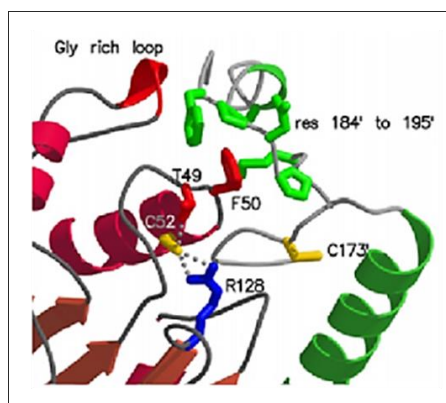
Figura 33: Esquema da reação de um homodímero de 2-Cys típica TXNPx. As duas subunidades estão representadas por azul e dourado. O rearranjo da estrutura terciária no sítio ativo (representado apenas um), de uma estrutura totalmente dobrada (FF) para uma desdobrada localmente (LU), permite a formação da ligação dissulfeto. Ao exercer a atividade peroxidase, o íon sulfuroso de Cys_p (S⁻) é oxidado a ácido sulfênico (-S-OH). A redução por tioredoxina (Trx) restaura TXNPx ao estado reduzido. Em condição de superoxidação ocorre a formação de ácido sulfínico e sulfônico, a enzima assume a conformação local estabilizada desdobrada (*LU).



Fonte: Modificado de Angelucci et al., 2016.

O sítio ativo, em *T. cruzi*, encontra-se numa região que se abre na interface dímero-dímero próxima a Cys52. Este resíduo catalítico está posicionado na porção N-terminal da hélice $\alpha 1$ que se encontra na parte interna do bolso formado pelos resíduos Met56, Phe50, Val51, Pro45 e Thr49. O grupo sulfidril de Cys52 forma ligação de hidrogênio com os átomos O de Thr49 e N de Arg128 (Figura 34). O outro resíduo ativo, Cys173 da segunda molécula do homodímeros, está localizado em um ambiente hidrofóbico formado pelos resíduos Ala162, Phe165, Trp177 e Thr183. Os dois resíduos Cys catalíticos estão distantes para interagirem um com o outro no estado reduzido de TXNPx. O desdobramento dos sítios ativos de ambos os resíduos Cys e o braço de C-terminal é essencial para a formação da ligação dissulfeto entre Cys52 e Cys173 das subunidades após a oxidação para formar o ácido sulfênico durante o ciclo catalítico. O processo chave é a interação entre os átomos S de Cys52 e O de Thr49. Uma vez que o átomo S de Cys52 foi oxidado a ácido sulfênico por hidroperóxidos, o grupo guanidil de Arg128 estabiliza a posição de Cys52 oxidada. Ocorre um rearranjo estrutural no qual o braço C-terminal desdobra e permite a formação da ligação dissulfeto. O resíduo Phe50, adjacente a Thr49, é o principal contribuidor para a interface homodimérica. Esse resíduo aromático interage quase que exclusivamente com os resíduos no braço C-terminal da subunidade adjacente, Met184, Pro186, Asp187, Pro188, Ser191 e Phe195. Esse desdobramento do braço C-terminal é modulado pelo laço rico em glicina (PIÑEYRO et al., 2005).

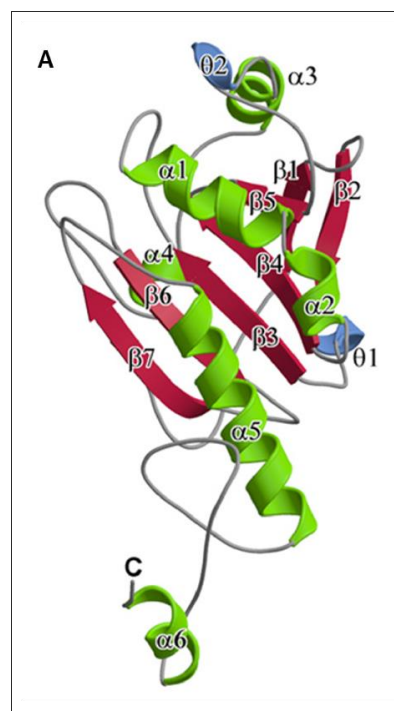
Figura 34: Sítio ativo de TXNPx. Resíduos Thr49 (vermelho) e Arg128 (azul) interagem por ligação hidrogênio com Cys52 (cisteína peroxidática, amarelo), na outra subunidade do homodímero está Cys173 (cisteína resolução, amarelo). Os resíduos Met184, Pro186, Asp187, Pro188, Ser191 e Phe195(verdes) presentes no C-terminal interagem com a cadeia lateral do resíduo Phe50 (vermelho).

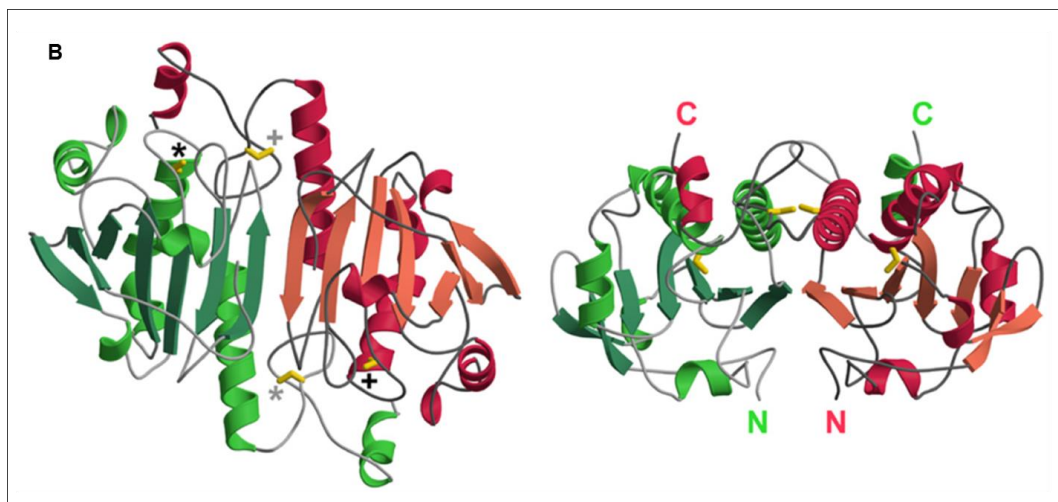


Fonte: Modificado Piñeyro et al., 2005.

Em *T. cruzi*, peroxiredoxina forma monômero de forma elipsoidal, a cadeia polipeptídica é constituída por sete dobras- β , cinco hélices- α e duas hélices- 3_{10} (Figura 35). O monômero apresenta domínio que forma a dobra típica da superfamília tioredoxina, constituído por cinco das sete dobras- β ($\beta 5$ - $\beta 4$ - $\beta 3$ - $\beta 6$ - $\beta 7$ que correspondem a $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 2$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ em tioredoxina) e quatro hélices- α ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$). Apresenta dois domínios conservados de cisteínas redutoras ativas 2-Cys típica. Os resíduos de cisteína essenciais para a atividade estão posicionados na hélice- $\alpha 1$ e hélice- $\alpha 5$. O dímero forma uma estrutura elipsoidal na qual as estruturas de dobras- β das duas subunidades monoméricas são mantidas por ligações de hidrogênio (PIÑEYRO et al. 2005). Os monômeros de TXNPx podem formar isoformas de dímeros ou tetrâmeros (PIÑEYRO et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2009). A estrutura quaternária de peroxiredoxina é constituída por cinco homodímeros (formado por dois monômeros) que se associam e formam uma estrutura decamérica de formato toroidal (Figura 36). As interações entre as interfaces dos dímeros é principalmente hidrofóbica, mas existem algumas ligações de hidrogênio. As associações entre os monômeros são mais fortes do que entre os dímeros (PIÑEYRO et al. 2005).

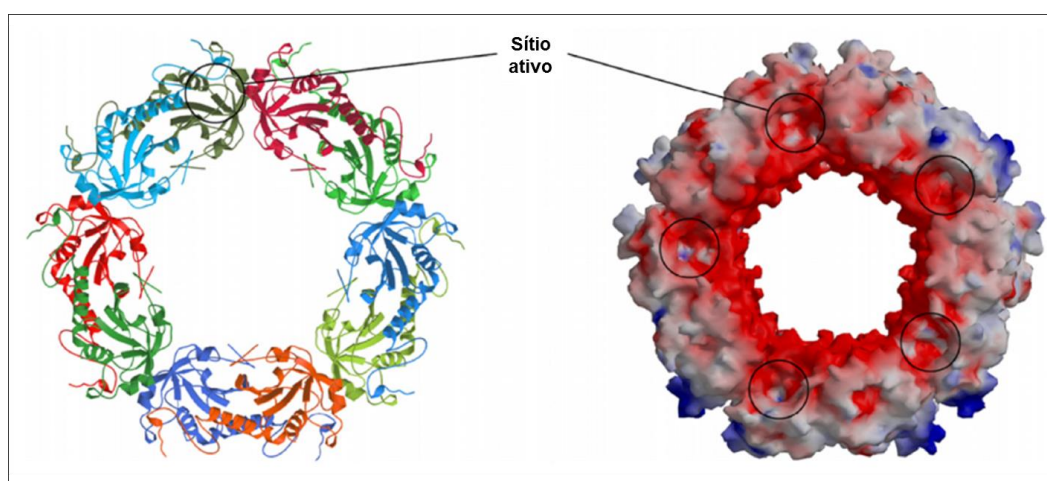
Figura 35: Estruturas de peroxiredoxina de *T. cruzi*. (Painel A): Estrutura do monômero - a estrutura secundária está representada pelas cores, vermelho: dobras- β ; verde: hélices- α ; azul: hélices- 3_{10} . (Painel B): Estrutura do dímero. À esquerda, vista paralela; à direita, vista perpendicular. Os resíduos catalíticos de cisteínas estão indicados em amarelo e pelos sinais * e + para diferenciar os monômeros. Em preto * e + estão indicados os resíduos de cisteína peroxidática, os em cinza são cisteína resolução.





Fonte: Modificado de Piñeyro et al., 2005.

Figura 36: Estrutura decamérica da peroxiredoxina de *T. cruzi*. À esquerda, representação em fita do homodecâmero, na qual cada subunidade está representada por cores diferentes. À direita, representação da superfície do potencial eletrostático, negativa em vermelho e positiva em azul.



Fonte: Modificado de Piñeyro et al., 2005.

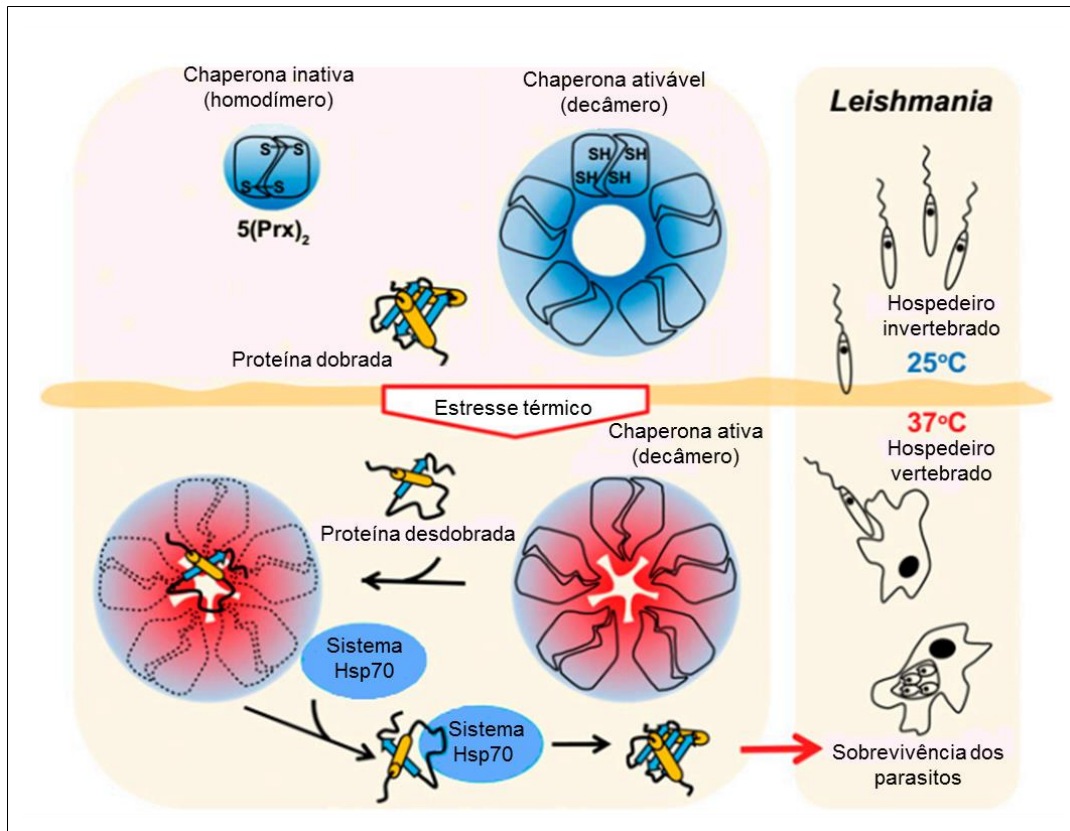
Em *T. cruzi*, TXNPx ocorre tanto na mitocôndria (mTcTXNPx) como no citosol (cTcTXNPx) (WILKINSON et. al., 2000; NOGUEIRA et al., 2009; PIÑEYRO et al., 2011). TXNPx apresenta um papel principal na minimização da formação de radicais derivados de peroxinitritos, como radical $\bullet\text{OH}$ e ânions de $\bullet\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3\bullet^-$, o que confere proteção ao parasito (PIACENZA et al., 2008), ao atuarem na redução de peróxido de hidrogênio e peróxinitrito (PIÑEYRO et al., 2011).

Nos estudos do papel de mTcTXNPx e cTcTXNPx na invasão e sucesso na infectividade, observou-se que os tripomastigotas aumentam a expressão dessas enzimas, demonstrando um importante papel na sobrevivência, replicação e diferenciação de *T. cruzi* (tripomastigotas para amastigotas) o que poderia constituir-se em fator de virulência (PIÑEYRO et al., 2008; PIACENZA et al., 2009a). O nível de expressão de mTcTXNPx e cTcTXNPx foi aumentado em epimastigotas de cepas resistentes, quando expostos a peróxidos (WILKINSON et al., 2000), H₂O₂ (PIACENZA et al., 2009a) e benzonidazol (NOGUEIRA et al., 2009). Em *Leishmania donovani*, TXNPx mitocondrial protege da morte celular programada, atuando na detoxificação e prevenção contra os danos às proteínas, DNA e lipídios causados por espécies reativas de oxigênio. Em *L. infantum*, o aumento na expressão de TXNPx citosólica aumentou a resistência a H₂O₂ (HARDER et al., 2006).

Amastigotas de *Leishmania infantum*, formas intracelulares em mamíferos, que não expressaram mTXNPx não sobreviveram em ambiente a 35 °C, ao ocorrer a mudança de temperatura de 25 °C (hospedeiro invertebrado) para 37 °C (hospedeiro mamífero). Essa inaptidão não estaria relacionada com a atividade peroxidase da enzima, pois em mutantes que expressaram mTXNPx, porém não tinham a cisteína peroxidática ativa, sobreviveram em ambiente a essa temperatura e foram capazes de infectar camundongos. A sobrevivência e a infectividade foram possíveis devido à outra função de mTXNPx, faria parte de um sistema proteostase. Parece que a ativação de mTXNPx para a atividade chaperona seria devido ao estresse térmico, baixo pH e estresse oxidativo; porém ainda não se sabe se a forma citosólica faria essa mesma atividade. Segundo Teixeira et al. (2015), em condição de estresse térmico *in vitro*, mTXNPx atuaria como chaperona na fase transição do parasito do hospedeiro invertebrado para hospedeiro mamífero, protege proteínas de formarem agregados; além do mais poderia auxiliar na proteção do parasito em condição de febre produzido pelo hospedeiro mamífero (TEIXEIRA et al., 2015).

A estrutura decamérica atuaria como um anel ligante chaperona, no qual a proteína cliente liga-se no centro do anel e mTXNPx estabilizaria a estrutura desdobrada. Desse modo, o decâmero atuaria como um sensor na mudança de temperatura ambiental, a transição que o promastigota passa de 25 °C a 37 °C (Figura 37), com isso os rearranjos estruturais protegeriam as proteínas termolábeis de formarem agregados (TEIXEIRA et al., 2015).

Figura 37: Função chaperona de mTXNPx em *Leishmania*. Exposição de *Leishmania* promastigota durante a transição da fase no inseto (25 °C) para o mamífero (37 °C) ocasiona desdobramento das proteínas. Essa mudança térmica é sentida por pelo decâmero de mTXNPx reduzida que é ativado para a função chaperona. Uma vez ativados, decâmeros de mTXNPx ligam-se à proteínas clientes no centro da estrutura em anel, o que previne a formação de agregados citotóxicos das proteínas clientes. As proteínas clientes são mantidas no estado redobrado e podem ser reativadas por membros do sistema Hsp70 em presença de ATP. A função chaperona de mTXNPx parece ser crucial para a adaptação de *Leishmania* a sobreviver a mudança de temperatura no hospedeiro mamífero e gerar amastigotas viáveis.



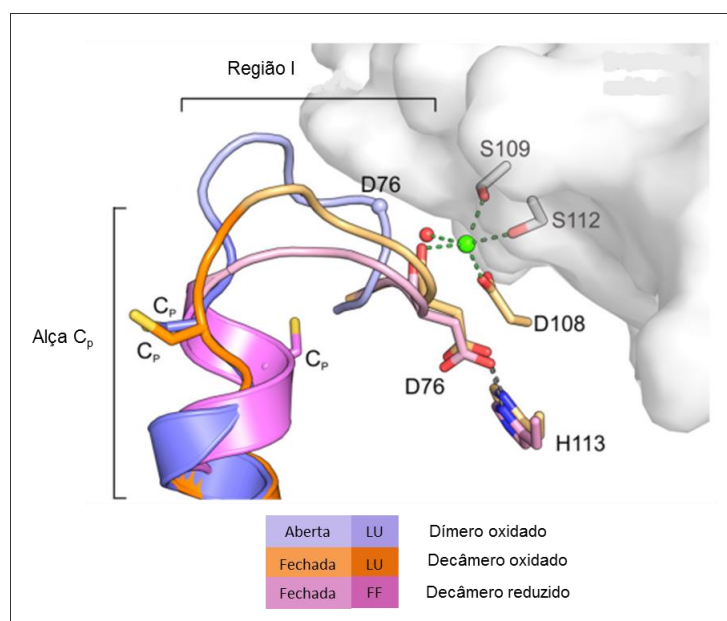
Fonte: Modificado de Teixeira et al., 2015.

Íons divalentes Ca^{+2} e/ou Mg^{+2} , presentes em tampões que contenham CaCl_2 e MgCl_2 , respectivamente, afetam a estrutura quaternária e a função de TXNPx mitocondrial em *L. infantum*. Em pH fisiológico, teste *in vitro*, TXNPx mitocondrial de *L. infantum* altera da forma dimérica para a decamérica na presença desses íons. Estimulam a atividade peroxidase e contribuem para manter a função chaperona. A oxidação de cisteína peroxidática e a ligação com a cisteína resolução resulta em baixa afinidade dos íons pela enzima oxidada. Ao contrário da forma mitocondrial, a forma citosólica de TXNPx em *L. infantum* não depende do efeito desses íons para estabilizar o decâmero. O decâmero é formado quando cinco homodímeros se ligam ao outro, via interface tipo A; a formação dessa interface depende da

mudança conformacional na região I (metionina, aspartato, fenilalanina, treonina, fenilalanina - MDFTF) que pré antecede a alça da cisteína peroxidática. O efeito de Ca^{+2} e/ou Mg^{+2} na estabilização do decâmero está relacionado com a ligação na interface A e a concomitante estabilização da região I. A ligação desses íons é numa região com cavidade carregada negativamente constituída por Asp 76 (D 76) na região I e Asp 108 (D 108), Ser 109 (S 109) e Ser 112 (S 112) na região II, posterior a alça da cisteína peroxidática. Esses resíduos de aminoácidos coordenariam o íon Ca^{+2} e/ou Mg^{+2} que assumiria uma geometria bipiramidal (Figura 38). Mutantes de *L. infantum* que não apresentam Asp 108 e Ser 109 não apresentaram a forma decamérica de TXNPx mitocondrial, apenas a dimérica, o que demonstrou serem essenciais para a ligação do Ca^{+2} e/ou Mg^{+2} estabilizarem o decâmero. A estrutura decamérica contribui para a ótima orientação do substrato e a ativação da cisteína peroxidática catalítica para reduzir o peróxido de hidrogênio (MORAIS et al., 2017).

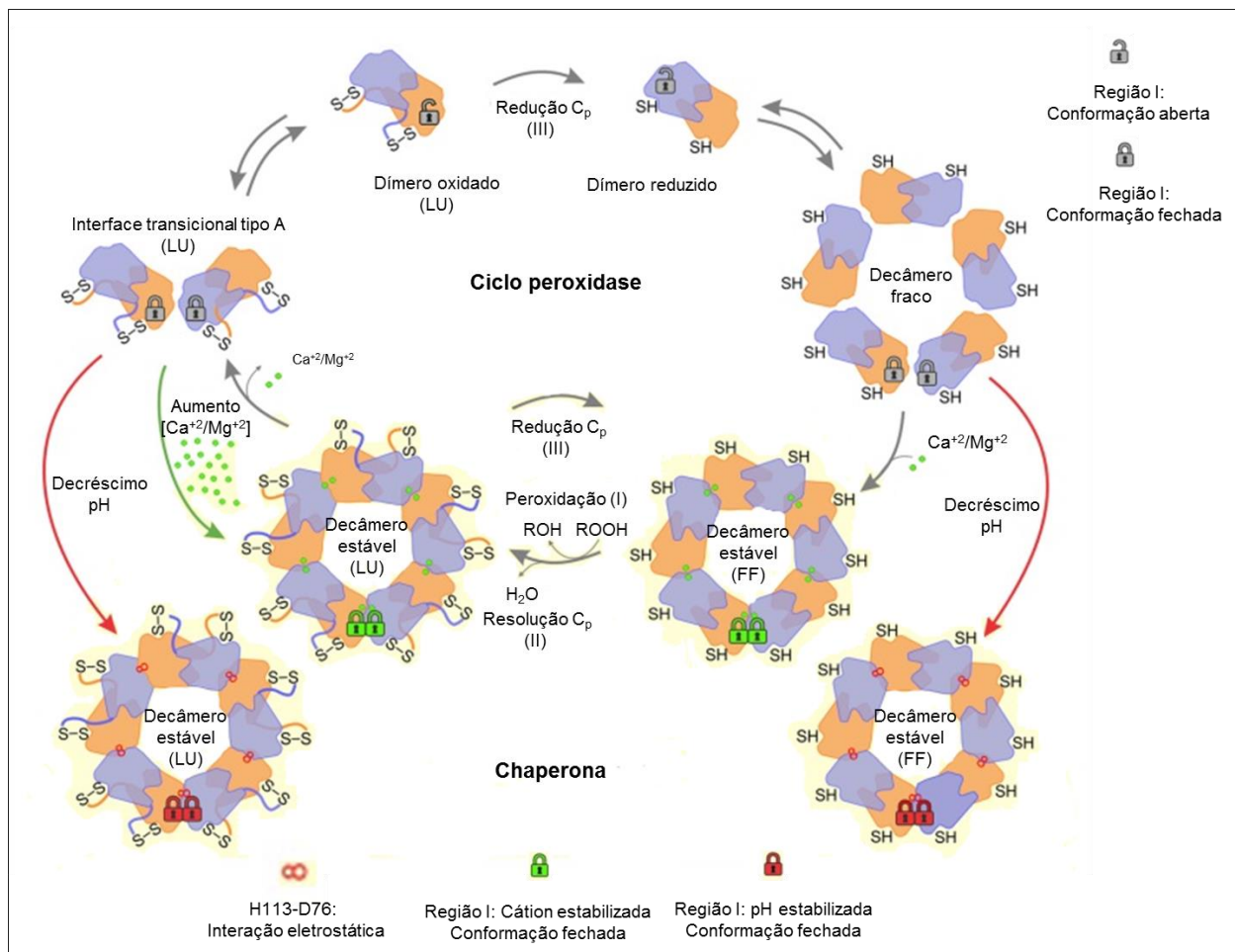
Segundo Moraes et al., (2017), TXNPx mitocondrial de *L. infantum* apresenta a forma dimérica quando oxidada e decamérica quando reduzida (Figura 39). Durante o estresse térmico, fase de transição do hospedeiro inseto para o hospedeiro mamífero, ocorre um aumento de Ca^{+2} na mitocôndria, com isso o decâmero oxidado passa a função de chaperona. Além do estímulo pelo Ca^{+2} na mitocôndria, o aumento desse íon no citosol faz ocorrer decréscimo no pH mitocondrial, outro estímulo para que TXNPx assuma a forma decamérica (MORAIS et al., 2017).

Figura 38: Estabilização da região I na conformação fechada que é requerida para manter a conformação totalmente dobrada da alça da cisteína peroxidática (C_p) após a redução de C_p . Azul: Dímero de TXNPx mitocondrial oxidado de *L. infantum*; Laranja: Decâmero de TXNPx mitocondrial oxidado de *L. infantum*; Esfera verde: Íon Ca^{+2}/Mg^{+2} ; Lilás: Decâmero de TXNPx mitocondrial reduzido; Cinza: Interface tipo A. Região I apresenta conformação em dímero aberto, porém assume uma conformação fechada no estado de decâmero oxidado e reduzido. A estabilização da região I na conformação fechada requiere a ligação hidrogênio entre os resíduos D76 e H113 e os íons Ca^{+2}/Mg^{+2} . FF: Totalmente dobrado; LU: Desdobramento local.



Fonte: Modificado de Moraes et al., 2017.

Figura 39: Funções dos íons $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}/\text{pH}$ e estado redox na manutenção da chaperona de TXNPx mitocondrial em *L. infantum*. Durante o ciclo peroxidase, TXNPx mitocondrial intercambia entre as formas dimérica (chaperona inativa) e decamérica (chaperona ativa). Essa mudança oligomérica é regulada por mudanças conformacionais de duas regiões na alça da hélice, a cisteína peroxidática C_p (local desdobrado - LU $\leftrightarrow$ totalmente dobrada - FF) que é redox sensível, e a região I (aberta $\leftrightarrow$ fechada) que é $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}/\text{pH}$ sensível. Após a peroxidação (I) e resolução (II), decâmeros oxidados (S-S) tendem a liberar $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ e dissociar em dímero. Esse processo requer um estado intermediário (estado transicional interface tipo A). Dois mecanismos podem impulsionar a função chaperona, principalmente para estabilizar a o decâmero oxidado, o decréscimo no pH (flecha vermelha) e o aumento de $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (flecha verde).



Fonte: Modificado de Moraes et al., 2017.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As cepas Y, SIGR3 e SI8 (RIMOLDI et al., 2012) e SI1 (RIBEIRO et al., 2015) são classificadas como TcII, a cepa QMII como TcIII (RIBEIRO et al., 2015) e a cepa Bolívia como TcI (MESSENGER et al., 2015). Resultados obtidos por Kohatsu (2013) demonstraram que as cepas, das formas epimastigotas de *T. cruzi*, de grupos diferentes (Bolívia - TcI; Y, SIGR3, SI8 e SI1 – TcII; QMII - TcIII) ou do mesmo grupo (Y, SIGR3, SI8 e SI1 - TcII) não *in vitro* induzidas para desenvolvimento de resistência, apresentaram distintas suscetibilidades ao benzonidazol e aos derivados de diaminas do ferroceno.

As sequências de triparedoxina peroxidase mitocondrial - mTcTXNPx (GenBank: CAA06923), superóxido dismutase mitocondrial - mTcSOD (GenBank: AAX84936) e *old yellow enzyme* citosólica - cTcOYE (GenBank: U31282) foram subclonadas em vetor pET28a (Novagen) para a obtenção das proteínas recombinantes em *E. coli*, que foram posteriormente empregadas na produção de anticorpos policlonais, produzidos em coelhos. Os anticorpos foram utilizados na análise da expressão das proteínas de mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE de *T. cruzi*.

As cepas expressaram diferencialmente mTcTXNPx, mTcSOD e cTcOYE, mesmo quando tratadas com a mesma substância citotóxica. Todas as cepas apresentaram diferenças na expressão do polipeptídeo de 25,5 kDa de mTcTXNPx e foram detectados polipeptídeos de tamanho entre 46 e 58 kDa, considerados como possíveis isoformas de mTcTXNPx. Entretanto, apenas a cepa Y aumentou a expressão de mTcTXNPx de 25,5 kDa no tratamento com um dos derivados de diaminas do ferroceno (KOHATSU, 2013).

Bosquesi (2013) demonstrou por testes *in vitro* com *T. cruzi*, que os derivados benzofuroxânicos (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol) apresentaram-se citotóxicos para as formas epimastigotas da cepa Y, bem como para amastigotas da cepa Tulahuen. Na avaliação *in vivo* em camundongos, essas substâncias não foram mutagênicas.

Dado que apenas a cepa Y demonstrou um aumento na expressão de mTcTXNPx, com a formação de possíveis isoformas, após tratamento com substância tripanossomicida, relacionada com a via óxido-redutora e ainda, derivados benzofuroxânicos foram citotóxicos para *T. cruzi*, decidiu-se estudar a cepa Y como padrão e a expressão da enzima mTcTXNPx frente à ação dos derivados benzofuroxânicos.

O presente estudo utilizou a forma epimastigota de *T. cruzi*, devido à facilidade de manipulação, baixo custo de manutenção e menor risco de acidentes durante a sua manipulação. Segundo Molina-Garza et al. (2014) existe uma boa correlação positiva no uso de epimastigotas na prospecção de substâncias ativas. Epimastigotas também tem sido utilizados na busca por substâncias anti *T. cruzi* em larga escala (MERCALDI et al., 2014). Existem dados na literatura que utilizam as formas epimastigotas e tripomastigotas na avaliação de proteínas do metabolismo oxidativo (ANDRADE et al., 2008; PIÑEYRO et al., 2008; PIACENZA et al., 2009a), nas quais as cepas resistentes, de ambas as formas, expressam em maior quantidade essas proteínas, assim os resultados obtidos neste estudo com as formas epimastigotas podem ser similares em formas tripomastigotas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

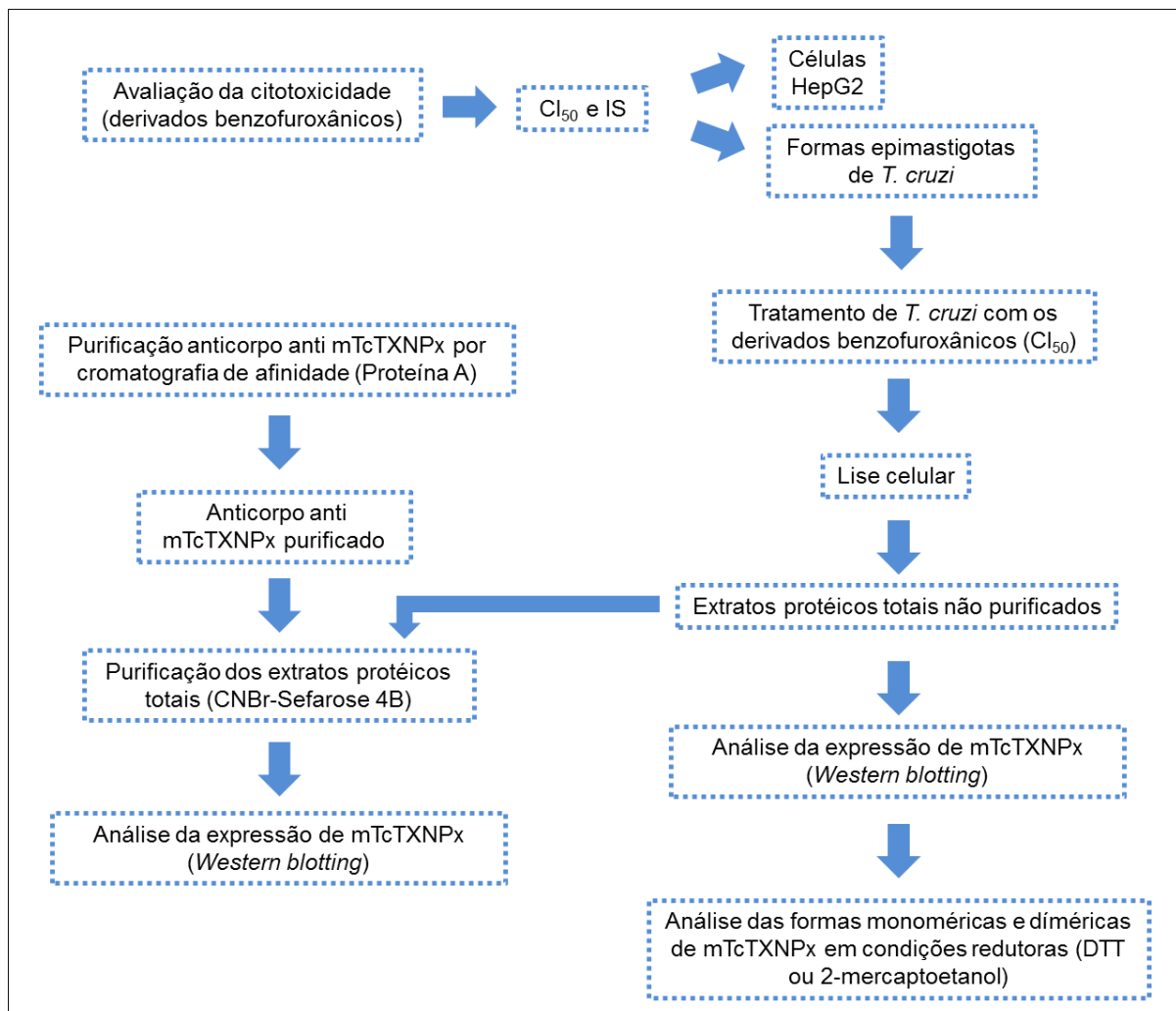
Avaliar a citotoxicidade dos derivados benzofuroxânicos, BZFS e BZTS, em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e em células de mamífero HepG2. Analisar o nível de expressão de mTcTXNPx relativo ao metabolismo oxidativo frente à ação dos derivados benzofuroxânicos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de derivados benzofuroxânicos em formas epimastigotas de *T. cruzi* e células HepG2;
- Tratar *T. cruzi* com os derivados benzofuroxânicos para a obtenção dos extratos protéicos totais;
- Avaliar diferenças na expressão da enzima mTcTXNPx após tratamento com os derivados benzofuroxânicos por *Western blotting*;
- Caracterizar a formação de monômeros e dímeros de mTcTXNPx em condições redutoras mantidas por DTT ou 2-mercaptoetanol;
- Purificar anticorpo anti mTcTXNPx por cromatografia de afinidade (Proteína A) para purificação de extratos protéicos totais;
- Purificar os extratos protéicos totais por cromatografia de afinidade (CNBr-Sepharose 4B).

FLUXOGRAMA

Fluxograma dos experimentos.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Meio de cultura, soluções e géis

Meio de cultura para *T. cruzi*:

68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄ ; 111 mM dextrose; 0,3% caldo de infusão de fígado (Difco); 0,5% triptose. Dissolver com água destilada. Acertar pH 7,2 com HCl. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos 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 hemina (Sigma), previamente dissolvida em 50 mM NaOH e filtrada com filtro de 0,22 µm (TPP).

MTT:

2,5 mg/mL MTT (Sigma) dissolvido em água deionizada; aliquotar em tubos envoltos em papel alumínio e armazenar a -20 °C

MSF:

0,22 mg/mL MSF (Sigma) dissolvido em água deionizada; aliquotar em tubos e armazenar a -20 °C

Corante SDS-PAGE:

Corante: 0,1% *Coomassie brilliant blue*; 40% etanol; 10% de acético glacial; completar com água destilada para o volume final

Descorante: 40% etanol; 10% ácido acético glacial; completar com água destilada para o volume final

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; completar com água destilada para o volume final

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% PSA 10%; 0,1% TEMED; completar com água destilada para o volume final

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; completar com água destilada para o volume final

Tampão para lise celular (extrato total):

7 M uréia; 2 M thiouréia; 40 mM Tris; 4% HCAPS (Sigma); 0,1 mg/mL FFMS (previamente dissolvido em isopropanol); completar com água destilada para o volume final e adicionar inibidores de proteases 2 µg/ mL pepstatina, 10 µg/mL leupeptina e 10 µg/mL aprotinina

Tampão tris wash:

100 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; completar com água destilada para o volume final

Tampão de amostra (acompanhar amostra na eletroforese):

1 M Tris-HCl pH 6,8; 5% dodecil sulfato de sódio 10%; 25% glicerol; 2,5 mg/mL azul de bromofenol; 250 mM DTT ou 2-mercaptoetanol

Tampão tris glicina (eletroforese):

5 mM Tris; 50 mM glicina; 0,02% SDS 10%; completar com água destilada para volume final

Tampão de transferência (Western blotting):

48 mM Tris; 39 mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol; completar com água destilada para volume final

Tampão TFS:

130 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄; completar com água destilada para volume final

Tampão TTS:

50 mM Tris; 150 mM NaCl; completar com água destilada para volume final

Tampões para purificação de anticorpo IgG:

Tampão A (ligação): 0,02 M NaH₂PO₄; 0,15 M NaCl, ajustar pH 8,0

Tampão B (eluição): 0,2 M Na₂HPO₄; 0,1 M ácido cítrico, ajustar pH 3,0

Tampões para purificação de extrato total:

Tampão de acoplamento: 0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,3

Tampão de lavagem (ácido): 0,1 M acetato de sódio; 0,5 M NaCl; pH 4,0

Tampão de lavagem (básico): 0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,0

Tampão de ligação: 75 mM Tris-HCl; pH 8,0

Tampão de eluição: 100 mM glicina-HCl; 500 mM NaCl; pH 2,7

Tampão de reequilíbrio da coluna (básico): 0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,5

Tampão de reequilíbrio da coluna (ácido): 0,1 M acetato de sódio; 0,5 M NaCl; pH 4,5

4.2. Culturas de *T. cruzi* e células HepG2

A cultura da forma epimastigota da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) de *T. cruzi*, foi mantida a 28 °C em meio LIT - *liver infusion tryptose* (FERNANDES; CASTELLANI, 1966), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Invitrogen).

A cultura de células HepG2 (ADEN et al., 1979) foi mantida a 37±2 °C em estufa com 5% de CO₂, em meio MEM - *minimum essential media* (Sigma), suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina e 0,1 mg/mL estreptomicina (EAGLE, 1959; CHIARI et al., 2012).

4.3. Avaliação da citotoxicidade em *T. cruzi* e células HepG2

O ensaio biológico colorimétrico *in vitro* baseado na redução do sal MTT mede a viabilidade celular. O sal MTT é reduzido a formazan (forma um precipitado roxo) pela ação da succinatodesidrogenase, 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).

A viabilidade celular de *T. cruzi* foi analisada a partir dos ensaios citotóxicos colorimétricos *in vitro*, segundo procedimento descrito por Cotinguiba et al. (2009). As substâncias testadas são derivados benzofuroxânicos, benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol-1-*N*-óxido: 6-((metil)benzo[*c*](2-carbamoilidrazona)-1-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol e 6-((metil)benzo[*c*](2-carbamotiolidrazona)-1-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol. Para facilitar a identificação dessas substâncias, foram denominadas BZFS e BZTS, respectivamente. Foram sintetizadas por Bosquesi (2013) e cedidas pela Profa. Dra. Chung Man Chin, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos.

Para *T. cruzi*, os testes iniciaram com culturas na concentração de 1×10^7 parasitos/mL. Os compostos estoques (20 mg/mL) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) para as diferentes concentrações (Tabela 1). Benzonidazol (BZ; Sigma) foi utilizado como controle positivo, enquanto que para o negativo havia apenas meio. Após 72 horas de incubação a 28 °C, foi adicionado 2,5 mg/mL MTT (Sigma). As placas foram incubadas por 75 minutos ao abrigo de luz a 28 °C. A seguir, foram adicionados 10% dodecil sulfato de sódio, as placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos a temperatura ambiente (Figura 40). 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 calculadas as concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀), através de regressão linear feita com o programa Origin 7.0 (WASS, 2002) de acordo com Cotinguiba et al. (2009). Para a análise estatística foi aplicado o método probit (MUELAS-SERRANO et al., 2000). Os testes foram realizados em triplicata em placas de cultura de poliestireno de 96 poços (TPP®).

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). As células HepG2 foram cedidas pela professora Dra. Vera Lucia Borges Isaac - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Cosmetologia.

A avaliação da citotoxicidade para as células HepG2 foi realizada segundo Chiari et al. (2012), testes realizados em triplicata em placas de cultura de células de 96 poços (TTP®). Os

testes iniciaram com culturas na concentração de 1×10^6 células/ mL. As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C em 5%CO₂ por 24 horas para a adesão das células aos poços das placas. Seguidas pela adição das substâncias. Foram feitos dois controles: meio de cultura sem tratamento (negativo) e meio de cultura acrescido de 10% DMSO (positivo). As substâncias estoque (20 mg/mL em DMSO) foram diluídas em meio MEM para as diferentes concentrações (Tabela 1). No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão TFS. Após 24 horas de incubação a 37 ± 2 °C, foi adicionado 1,0 mg/mL MTT (Sigma) e as placas foram incubadas, ao abrigo de luz, a 37 ± 2 °C por aproximadamente 5 horas. Após, adicionou-se isopropanol e incubou-se por aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 595 nm (*Microplate Reader* 550; BioRad). Como as concentrações das substâncias utilizadas para HepG2 foram muito superiores às utilizadas para os testes em *T. cruzi*, nessas diluições as substâncias formavam cristais. Para a retirada desses cristais, as substâncias foram centrifugadas a $2.600 \times g$ por 2 minutos (MiniSpin® plus; eppendorf) a temperatura ambiente, foram utilizados os sobrenadantes.. A partir das médias das concentrações e porcentagens das células viáveis (Tabelas anexas) foram obtidas as concentrações IC₅₀ para HepG2. O valor do índice de seletividade, IS, foi obtido a partir da razão entre os IC₅₀ de células HepG2 e IC₅₀ de *T. cruzi*.

Tabela 1: Concentrações dos ensaios citotóxicos em *T. cruzi* e células HepG2

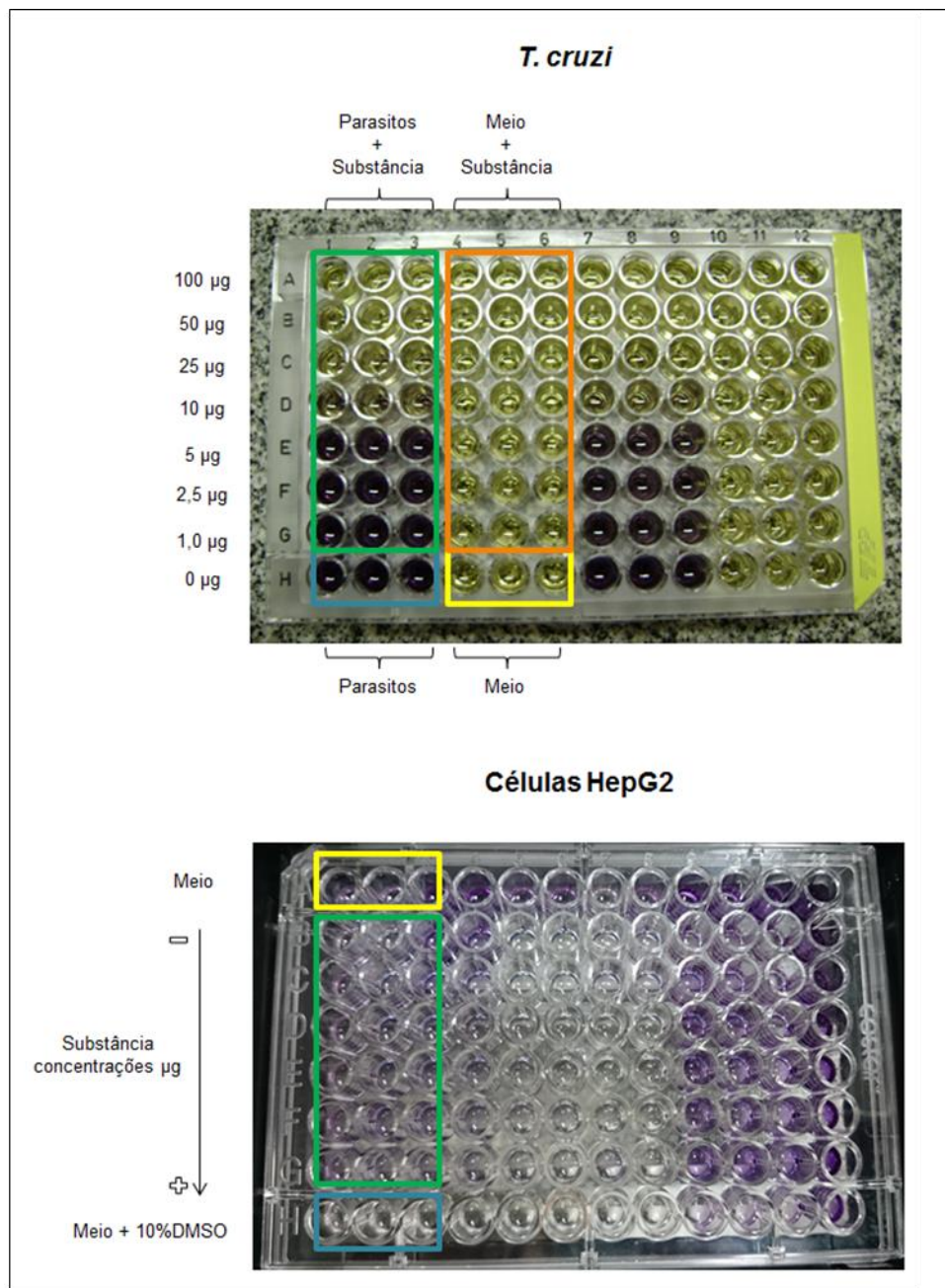
<i>T. cruzi</i> (µg/mL)		HepG2 (µg/mL)	
BZ/ BZFS/ BZTS	BZ	BZFS*	BZTS*
100	Cneg**	Cneg**	Cneg**
50	1500	1300	833,33
25	750	650	416,66
10	187,5	162,58	208,33
5	93,75	81,12	104,16
2,5	46,87	40,64	52,08
1	23,43	20,31	26,03
Cneg**	Meio cultura + 10% DMSO	Meio cultura + 10% DMSO	Meio cultura + 10% DMSO

* Média das concentrações

** Cneg: controle negativo

Fonte: Autor.

Figura 40: Culturas de *T. cruzi* e HepG2 após a adição de MTT. Quanto mais viável estiverem as células, maior a coloração roxa.



Fonte: Autor.

4.4. Exposição de *T. cruzi* aos derivados benzofuroxânicos e preparados dos extratos totais

As culturas em fase log de crescimento (início a 1×10^7 parasitos/mL) foram tratadas com BZFS e BZTS por 6 e 24 horas e mantidas a 28 °C em garrafas de cultura (TPP®). Nos tratamentos foram utilizadas as concentrações IC₅₀ da cepa Y. Benzonidazol (IC₅₀) foi utilizado como controle positivo. Após os períodos de incubação, as culturas foram centrifugadas, 3.000 x g por 7 minutos à temperatura ambiente, e lavadas com tampão *tris wash*, procedimento realizado por 2 vezes. Adicionou-se tampão de lise descrito por Parodi-Talice et al. (2004), que contém detergente neutro HCAPS (Sigma) acrescido dos inibidores de proteases: 2 µg/ mL pepstatina, 10 µg/mL leupeptina, 10 µg/mL aprotinina e 0,1 mg/mL fluoreto de fenilmetanosulfonil. A seguir, essas culturas acrescidas de tampão de lise foram mantidas sob leve rotação (260H; Adamo), por 2 horas a 4 °C. Essas amostras foram centrifugadas, 3.000 x g por 7 minutos, as frações sobrenadantes foram coletadas, essas frações são referentes aos extratos totais, e armazenadas a -80 °C até o momento de uso (KOHATSU et al., 2017).

4.5. Análise da sequência de mTcTXNPx

O programa Gene Runner V 3.05 (SPRUYT; BUQUICCHIO, 1994) auxiliou na tradução da sequência de nucleotídeos, determinação do peso molecular estimado e quantidade de aminoácidos. O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos foi realizado com o Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) para a busca por regiões conservadas que contém a cisteína ativa, responsável pela atividade peroxidase de mTcTXNPx.

4.6. Análise da expressão de mTcTXNPx

As proteínas dos extratos totais foram quantificadas com reagente Bradford (BioAgency). Alíquotas dos extratos totais, em tampão de amostra que contém 250 mM ditiotreitol, foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos. As amostras (10 µg) foram aplicadas em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 10%). Para a eletroforese vertical (SE 250 *mini vertical*; GE Healthcare) foi utilizado tampão tris glicina. A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (GE Healthcare) e acondicionadas em unidade de

transferência de proteínas (*Semi-dry* TE77; GE Healthcare) por 1 hora a 4 °C. Procedeu-se com *Western blotting*, procedimento descrito em Kohatsu et al. (2017). A membrana foi ativada com metanol e depois tampão de transferência, mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos cada. Após a transferência de proteínas para a membrana, esta foi bloqueada com solução 5% leite desnatado diluído em tampão TTS, por 1 hora a temperatura ambiente e sob leve agitação. A membrana foi incubada com anticorpo anti mTcTXNPx, diluído em tampão TTS (1:400), por 18 horas a 4 °C, sob leve agitação. No dia seguinte, lavar a membrana com tampão TFS acrescido de 0,1% Tween-20, realizar o procedimento 3 vezes e 5 minutos cada a temperatura ambiente. Armazenar a membrana com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000), diluído em solução 2% leite desnatado, por 1 hora sob leve agitação a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, foi adicionada solução de 2,5 mM luminol (Sigma) e 40 mM H₂O₂ na membrana, a seguir, a acondicionou-se em cassette com filme radiográfico (*CL-XPosure Film*; Thermo Fisher Scientific).

O luminol (5-amino-2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona) é oxidado por peroxidase, reação quimioluminescente na qual peróxido de hidrogênio é co-oxidante, forma o íon aminoftalato no estado excitado, que ao retornar ao estado basal emite luz (MARQUETTE; BLUM, 2006).

4.7. Avaliação da condição redutora por DTT ou 2-mercaptoetanol

A condição redutora empregada na análise de monômeros e dímeros de mTcTXNPx presentes nos extratos totais foi realizada pelo método modificado de CHAE et al. (1994). As culturas de *T. cruzi* foram tratadas com a substância BZTS (concentração IC₅₀) por 24 horas. Procedeu-se com a lise celular para a obtenção de extratos totais como descrito em Kohatsu et al. (2017). Essas amostras foram incubadas por 5 minutos, à temperatura ambiente, com diferentes concentrações de agentes redutores, ditioneitol (DTT) ou 2-mercaptoetanol. As concentrações utilizadas foram: 0, 150, 250, 350 e 450 mM. A seguir, as amostras foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos e procedeu-se com *Western blotting*.

4.8. Purificação de anticorpo anti mTcTXNPx

Foram purificados os anticorpos policlonais IgG de mTcTXNPx, obtidos em coelho, produzidos por Kohatsu (2017). A purificação por cromatografia de afinidade foi realizada com modificações no protocolo do fabricante (Sigma). A coluna (*Poly-Prep*®

Chromatography Column; Bio-Rad) foi lavada com 50 mL água deionizada e seca ao ambiente. Diluiu-se 250 mg proteína A (*protein A-sepharose* CL-4B; Sigma) em 250 μ L tampão A (pH 8,0) e homogeneizou-se delicadamente; a seguir, essa resina foi adicionada na coluna. Após a resina empacotar, a coluna foi lavada com 5 mL tampão A. Foram adicionados 750 μ L soro na coluna. Essa amostra foi coletada e repassada na coluna por uma hora. Após esse período, a coluna foi lavada com 2,5 mL tampão A. Procedeu-se a eluição com 1,25 mL tampão B (pH 3,0). Foram coletadas frações de 500 μ L em tubos, envoltos em gelo, previamente adicionado 0,1 M NaOH. A coluna foi reequilibrada com 7,5 mL tampão. A coluna foi armazenada com 8 mL tampão A e 2 mL etanol, sob refrigeração a 8 °C.

4.9. Confirmação da purificação e reatividade do anticorpo anti mTcTXNPx

A confirmação da purificação do anticorpo foi feita a partir de eletroforese (SDS-PAGE 10%). As amostras das frações purificadas (5 μ g) foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos em tampão de amostra com 250 mM 2-mercaptoetanol. Após a eletroforese, o gel foi corado com 0,1% *Coomassie brilliant blue* R-250.

Na confirmação da reatividade do anticorpo purificado, amostras de extratos totais (10 μ g) foram submetidas à eletroforese; a seguir as proteínas foram transferidas para membrana fluoreto de polivinilideno (GE Healthcare) e procedeu-se com *Western blotting*. Incubou-se com o anticorpo anti mTcTXNPx purificado (1:400), e como segundo anticorpo anti IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000). A revelação foi com 2,5 mM luminol (KOHATSU, 2013). Para comparação, esse procedimento também foi realizado com anticorpo anti mTcTXNPx não purificado.

4.10. Quantificação das proteínas no extrato total e do anticorpo purificado anti mTcTXNPx

Aminoácidos com a cadeia lateral aromática, triptofano e tirosina absorvem na faixa UV, entre 230 a 300 nm (BRAY et al., 1994; ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016). No caso de arginina e lisina, o corante Coomassie blue G-250 liga-se a esses aminoácidos, muda de cor, de vermelho (estado protonado) para azul (estado aniônico ao interagir com o aminoácido da cadeia polipeptídica), e absorve a 595 nm (BRADY; MACNAUGHTAN, 2015).

As proteínas presentes nos extratos totais, a proteína recombinante mTcTXNPx e o anticorpo anti mTcTXNPx purificado foram quantificados com reagente Bradford

(BioAgency), leitura em espectrofotômetro a 595 nm de absorbância (DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer; Beckman), segundo as instruções do fabricante. Foi utilizada albumina de soro bovino como padrão, nas seguintes concentrações: 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL. A concentração do anticorpo purificado também foi determinada por espectrofotômetro UV a 280 nm.

4.11. Purificação de extrato total

A purificação do extrato total foi feita segundo as instruções do fabricante (GE Healthcare). Dissolver o ligante (5 mg anticorpo/mL meio) em tampão de acoplamento (5 mL tampão/grama de CNBr), acondicionar em gelo até o momento de uso. Preparar o meio, cada 1 grama de resina CNBr (CNBr-activated SepharoseTM 4B; GE Healthcare) fornece 3,5 mL de meio. Adicionar a resina em filtro (membrana 0,45 µm; diâmetro 47 mm; EXACTA) a vácuo. Lavar a resina com 1 mM HCl gelado; pH 3,0 (aproximadamente 200 mL), adicionar em alíquotas, por 15 minutos. Adicionar num tubo, o ligante em tampão de acoplamento e a resina filtrada. Deixar o tubo sob leve agitação a 4 °C *overnight*, não utilizar agitador magnético (rompe *beads* de sefarose). No dia seguinte, adicionar essa solução no filtro a vácuo, lavar com tampão de acoplamento (5 volumes de meio). Retirar o filtrado e bloquear os grupos ativos restantes com 1 M Tris-HCl, pH 8,0; acondicionar parado num béquer a temperatura ambiente por 2 horas. Filtrar a vácuo em 3 ciclos com alternância de pH, lavar com 5 volumes de meio, cada ciclo consiste de duas soluções: ácida (0,1 M acetato de sódio; 0,5 M NaCl; pH 4,0) e básica (0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,0). Adicionar, cuidadosamente, a resina na coluna (*Poly-Prep® Chromatography Column*; Bio-Rad) e esperar empacotar. Adicionar tampão de ligação (75 mM Tris-HCl; pH 8,0) na coluna e tomar o cuidado de não deixar a resina secar. Adicionar o extrato total na coluna, coletar e repassar na coluna por uma hora. Lavar a coluna com 10 volumes de coluna com tampão de ligação. Adicionar tampão de eluição (100 mM glicina-HCl; 500 mM NaCl; pH 2,7) e coletar as frações eluídas (500 µL/tubo) num tubo que contém 0,1 M NaOH para neutralizar as amostras. Reequilibrar a coluna 3 volumes de coluna com soluções que alternam pH, fazer ciclagem de 3 vezes, cada ciclo consiste de duas soluções: básica (0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,5) e ácida (0,1 M acetato de sódio; 0,5 M NaCl; pH 4,5). Armazenar a coluna de 4 a 8 °C, para uso posterior, com 80% tampão de ligação e 20% etanol.

4.12. Confirmação da purificação de extrato total

O gel SDS-PAGE foi corado com AgNO_3 segundo o protocolo de Arnosti (2011). O gel SDS-PAGE é deixado sob leve agitação por 30 minutos em solução 40% metanol com 10% ácido acético. A seguir, troca-se de solução, 10% etanol com 5% ácido acético, sob leve agitação por 30 minutos. Trocar a solução por água destilada, deixar sob leve agitação por 5 minutos; a seguir, trocar por 12 mM AgNO_3 (diluído em água) e deixar por 20 minutos. Lavar com água destilada por 1 minuto. Retirar a água destilada e acrescentar solução de 0,28 M carbonato de sódio com 0,0185% formaldeído até o aparecimento de bandas (aproximadamente 20 minutos), deixar sob leve agitação. O gel pode ser armazenado em solução 5% ácido acético a temperatura ambiente.

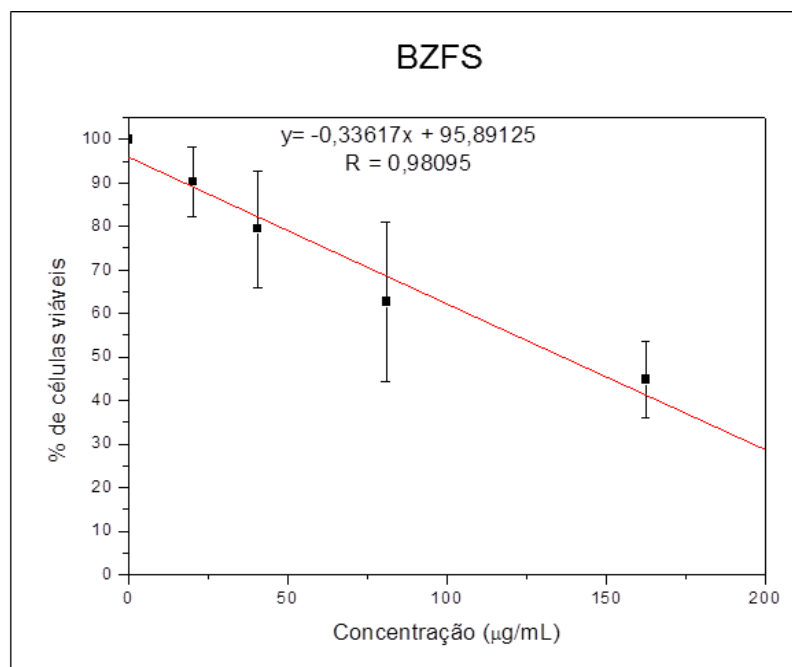
RESULTADOS E DISCUSSÃO

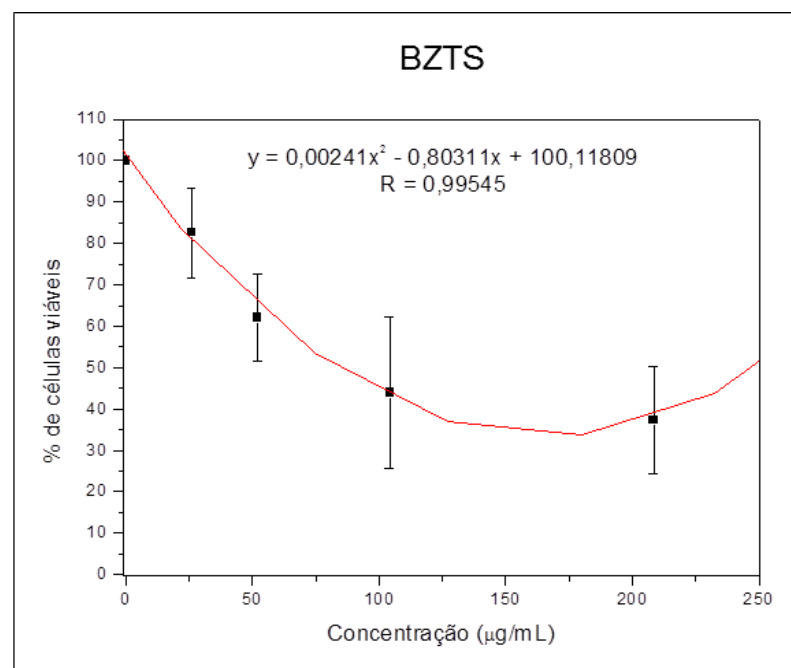
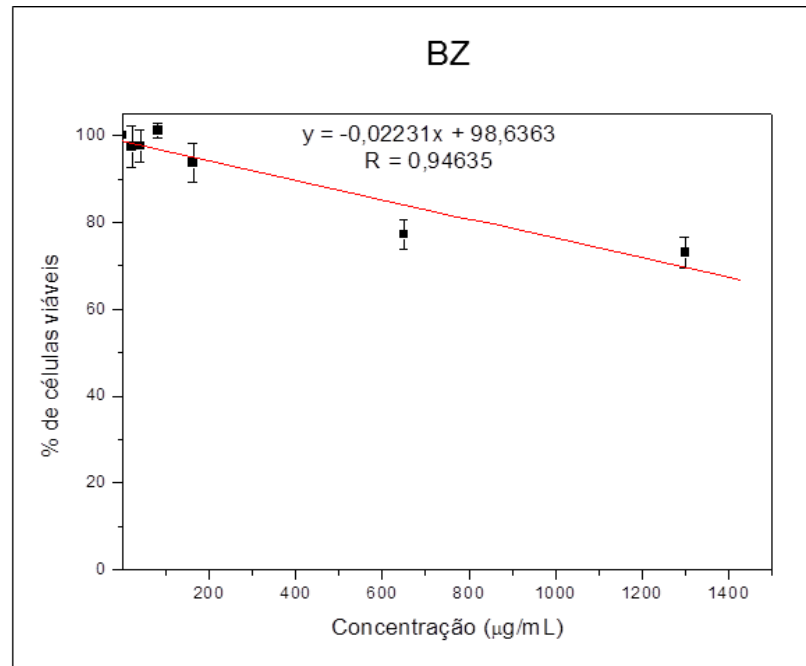
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da citotoxicidade em *T. cruzi* e células HepG2

As substâncias BZFS e BZTS demonstraram-se tóxicas para *T. cruzi* e apresentaram concentrações IC₅₀ próximas a aquela do benzonidazol (BZ) (Tabela 2). A partir dos gráficos das porcentagens de células viáveis (Figura 41) foram calculadas as concentrações de IC₅₀ para HepG2, obtidas das equações geradas pelo programa Origin 7.0 (WASS, 2002). Os valores dos IS obtidos demonstraram que as substâncias não são tóxicas para modelo de célula de mamífero; BZFS apresentou IS maior que BZTS (Tabela 2). O ensaio citotóxico com HepG2 demonstrou limitação para a substância BZTS, uma vez que formavam precipitados em concentrações superiores a 104,16 µg/mL (439,05 µM). Conforme o gráfico obtido (Figura 41 BZTS), observou-se o comportamento de queda na porcentagem de células viáveis e acima dessa concentração ocorre o inverso.

Figuras 41: Gráficos das porcentagens de viabilidade das células HepG2.





Fonte: Autor.

Tabela 2: Concentrações inibitórias e índice de seletividade de derivados benzofuroxânicos

Substâncias	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (µg/mL)*	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (µM)*	HepG2 IC ₅₀ (µg/mL)*	HepG2 IC ₅₀ (µM)*	IS
BZFS	6,88	31,10	136,51	617,21	19,84
BZTS	6,67	28,10	83,15	350,48	12,46
BZ	9,01	34,60	2180,02	8376,50	241,95

*Os valores foram obtidos a partir da regressão linear de triplicatas.

BZ: benzonidazol.

Fonte: Autor.

O aumento na produção de EROS em macrófagos e dentro do vacúolo parasitóforo é acompanhado pela perda no potencial de membrana e aumento de Ca^{+2} citosólico, indícios de que a célula está em apoptose (DE SOUZA et al., 2009). Na mitocôndria ocorre a via metabólica que é a principal fornecedora de energia para a célula, por isso danos à mitocôndria afetam a sua função e a viabilidade do parasito. Benzofuroxânicos, ao diminuir a atividade da desidrogenase, alteram a atividade da mitocôndria. Também interferem no potencial de membrana mitocondrial ao ocasionar a despolarização (BOIANI et al., 2010).

Em outro estudo, benzofuroxânicos afetaram o crescimento de *T. cruzi*, mas não induziram apoptose, porém formou-se um grande vacúolo citoplasmático de padrão autofágico, como a presença de membranas concêntricas e o autofagossomo circundado pelo retículo endoplasmático. A autofagia é um processo de auto degradação no qual ocorre remoção e/ou remodelação de estruturas celulares danificadas. Apesar de ocorrer decréscimo na liberação de acetato e succinato, que fazem parte do complexo da cadeia respiratória, a atividade da desidrogenase mitocondrial não foi afetada (BENÍTEZ et al., 2014). A apoptose também pode ser indicada pela despolarização da membrana mitocondrial de *T. cruzi*. A mitocôndria lesionada apresenta perda no potencial de membrana mitocondrial (ANDRÉO et al., 2015).

Bosquesi (2013) demonstrou que a presença do núcleo benzofuroxânico ao invés do furoxânico tornou os isómeros de nitrofural mais tóxicos para formas epimastigotas de *T. cruzi*: 31,10 µM e 28,10 µM, no caso de benzofuroxânicos, e maior que 100 µM e 400 µM, para furoxânicos. A maior toxicidade de hidroximetilnitrofural em relação ao nitrofural deve-se a presença da hidroxila que aumentou a hidrosolubilidade (CHUNG et al., 2003). Hidroximetilnitrofural demonstrou afetar a atividade biológica de *T. cruzi*, ao interferir no processamento de RNAm e com isso diminuir a produção de pequenos RNAs nucleares (U1,

U2 e U4 snRNA), consequentemente afeta o *trans-splicing* (BARBOSA et al., 2007). Por isso, avaliar a citotoxicidade dos benzofuroxânicos foi um estudo importante. A síntese de

benzofuroxânicos (BZFS e BZTS) hidroxilados seria interessante para verificar se a toxicidade em *T. cruzi* aumentaria.

Tiosemicarbazona e semicarbazona são classes de compostos utilizados com potencial uso medicinal devido suas capacidades de inibirem o crescimento de patógenos, antiviral, antibacteriano, antitumoral, antimalaria e anti tripanosomatídeos. Segundo se hipotetiza, tiosemicarbazona e semicarbazona apresentam como alvos, enzimas relacionadas com a síntese de DNA, consequentemente com a divisão celular, e habilidade em formar complexos com cátions metálicos, o que permite que esses compostos ajam como quelantes. Acredita-se também, embora não esteja bem esclarecido, que cisteína proteases de protozoários sejam alvos de tiosemicabazonas e semicarbazonas. Em estudo que compara tiosemicarbazona e semicarbazona, a presença do átomo de enxofre demonstrou ser mais citotóxica para *T. cruzi* que o átomo de oxigênio (SOARES et al., 2011). No presente estudo com benzofuroxânicos, a substância com o átomo de enxofre (BZTS), ao invés de oxigênio (BZFS), por essa razão, os estudos de expressão hora realizados com BZTS demonstrou ser mais tóxica para *T. cruzi*.

Além da hidrosolubilidade de uma substância, também é importante a sua hidrofobicidade. A hidrofobicidade é uma propriedade que demonstra a habilidade de um composto difundir-se através da membrana biológica. A atividade de um composto aumentará conforme aumenta a hidrofobicidade dos grupos substituintes, ou seja, a atividade aumenta conforme decresce a polaridade. Benzofuroxânicos com substituintes que tornam a molécula mais hidrofóbica apresentaram maior atividade anti *T. cruzi*. Substituintes que diminuem a doação de elétrons e tornam a região com alta densidade eletrônica, consequentemente a região apresenta-se negativa, como o oxigênio da carbonila e do grupo *N-óxido* diminuem a atividade citotóxica de benzofuroxânicos em *T. cruzi* (JORGE et al., 2013).

No presente estudo, os substituintes alteraram a citotoxicidade dos derivados benzofuroxânicos, por isso que BZTS foi mais tóxica do que BZFS que apresenta um átomo de enxofre e oxigênio, respectivamente. Devido ao enxofre ser menos eletronegativo que o oxigênio, fez com que BZTS fosse um pouco menos hidrofílico que BZFS. Consequentemente, a entrada pela membrana deve ter sido mais fácil e com isso mais quantidade dessa substância estava presente dentro de *T. cruzi*. Outro caminho que pode ter ocorrido é a disponibilidade em doar elétron nas reações oxidativas. O oxigênio, por ser mais eletronegativo que o enxofre, atrai elétron para si, consequentemente o anel benzofuroxânico

diminui a disponibilidade eletrônica para oxidar outras biomoléculas, com isso ocorre um decréscimo na sua citotoxicidade.

Benzofuroxânicos apresentam centros eletrofílicos que reagem com tiol, por isso podem oxidar proteínas anti oxidativas que apresentam tiol, proteínas de primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (BOIANI et al., 2010). Tem sido proposto que benzofuroxânicos por reagirem com o grupo tiol, apresentam potencial atividade inibidora de tripanotiona redutase. A estrutura $=N(\rightarrow O)O^-$ presente nos benzofuroxânicos confere as propriedades eletro-aceptoras similares aos compostos nitro-aromáticos ou *N-óxidos* citotóxicos (JORGE et al., 2013). Visto que benzofuroxânicos reagem com proteínas que contém tiol, então poderiam oxidar o tiol presente no resíduo de cisteína ativa de mTcTXNPx, importante enzima com atividade peroxidase e peroxinitrito redutase, para *T. cruzi* diminuir a produção de EROs e permitir que sobreviva em condição adversa ocasionada pelo estresse oxidativo.

Compostos nitroheterocíclicos e nifurtimox são reduzidos por *old yellow enzyme*. Menadiona, uma naftoquinona, liga-se ao anel flavina mononucleotídio (FMN) de *old yellow enzyme* e com isso inibe a atividade óxido-redutora dessa enzima em *T. cruzi* (YAMAGUCHI et al., 2011). Talvez benzofuroxânicos (composto nitroheterocíclico) reagem com proteínas que contenham o anel FMN, além daquelas que apresentam tiol. Por isso a expressão de *old yellow enzyme* poderia ser também avaliada em *T. cruzi* tratado com benzofuroxânicos e comparar se a alteração na produção dessa enzima é maior ou menor em relação à mTcTXNPx.

As células HepG2 são linhagens celulares hepáticas provenientes de hepatoblastoma humano e simulam as funções detoxificadoras de hepatócitos (JAVITT, 1990). Por isso tem sido utilizadas em estudos *in vitro* relacionados com a ação citoprotetora a agentes tóxicos, vias metabólicas de fármacos (WILKENING et al., 2003; MERSCH-SUNDERMANN, 2004) e segurança de substâncias presentes em cosméticos (CHIARI et al., 2012).

Benzonidazol (BZ) produz efeitos adversos como astenia, anorexia, urticária, lesão cutânea macular, epigastralgia, parestesia, mialgia e artralgia que podem levar à descontinuação do tratamento (PINAZO et al., 2010; PINAZO et al., 2013), apesar de não ser tóxico para cultura de macrófago (REVELLI et al., 1999).

Os derivados benzofuroxânicos demonstraram ser tóxicos para *T. cruzi*, porém não para células HepG2. Embora o IS de BZ seja maior que os de BZFS e BZTS, ainda não se sabe o comportamento *in vivo* dessas substâncias, se para organismos seriam mais tóxicas ou não que o fármaco utilizado, que tem demonstrado sérios efeitos adversos em humanos, mesmo que considerado não tóxico para macrófago. A concentração IC₅₀ de BZ em HepG2 e o IS foram aproximadamente 4 vezes superiores à aquela obtida por Velásquez et al. (2014), bem como o IS, ainda que com a mesma cepa Y. Possivelmente, essa variação nos valores seja devido ao estoque diferentes de células HepG2, pois os testes foram realizadas em triplicatas.

O ensaio citotóxico com HepG2 demonstrou limitação para a substância BZTS, uma vez que formavam precipitados em concentrações superiores a 104,16 µg/mL (439,05 µM). Conforme o gráfico obtido (vide Figura 41- BZTS), observou-se o comportamento de queda na porcentagem de células viáveis e acima dessa concentração ocorreu o inverso. Isso pode ser devido à formação dos precipitados e consequentemente o aumento na porcentagem de células viáveis. Então, para o cálculo do valor de IC₅₀, obtido a partir da equação gerada pelo programa Origin, foi levado em consideração a região decrescente da região do gráfico; desconsiderou-se a região crescente a partir da concentração de 104,16 µg/mL (439,05 µM). Portanto, o valor de IC₅₀ de HepG2 em presença de BZTS esperado deve estar acima do calculado teoricamente e consequentemente o IS também será mais elevado.

5.2. Análise da sequência de mTcTXNPx

Através do BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), a sequência parcial de mTcTXNPx foi comparada com as sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e as identidades encontradas foram apresentadas na Figura 42.

Figura 42: Identidade da mTcTXNPx de *T. cruzi*, cepa Y, com triparedoxina peroxidase mitocondrial de outros tripanosomatídeos obtida pelo BLAST.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
tryparedoxin peroxidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	288	288	94%	2e-97	99%	XP_806739.1
tryparedoxin peroxidase [Trypanosoma cruzi Dm28c]	287	287	94%	3e-95	98%	ESS61690.1
tryparedoxin peroxidase [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	222	222	94%	4e-71	71%	XP_847032.1
mitochondrial tryparedoxin peroxidase [Leishmania amazonensis]	207	207	94%	2e-65	69%	AA47429.1
hypothetical protein N302_08716 [Corvus brachyrhynchos]	150	150	70%	2e-43	65%	KF066215.1
hypothetical protein AB205_0117670 [Rana catesbeiana]	153	153	84%	9e-44	56%	PI022724.1

Fonte: Disponível em *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
Acesso em: 14 dezembro de 2017.

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de mTcTXNPx foi realizado com Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011), alinhamento *online* disponível no EMBL-EBI: *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A partir do alinhamento verificou-se que a sequência parcial de mTcTXNPx apresenta a região I (VCP) que contém o resíduo de cisteína, responsável pela atividade redutora da enzima (Figuras 43A) e a região carregada de ligação a íons $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ como ocorre em *L. braziliensis*, relacionada com formação de decâmeros de TXNPX mitocondrial (Figura 43B). A região I (VCP) demonstrou-se conservada entre os organismos analisados (Figura 44).

Figura 43: Alinhamento múltiplo de triparedoxina peroxidase de *T. cruzi*. (Painel A): mTcTXNPx: Sequência depositada de TcTXNPx mitocondrial (GenBank ID: CAA06923). cTcTXNPx: Sequência depositada de TcTXNPx citosólica (GenBank ID: CAA09922). Estudo: Sequência parcial de TcTXNPx mitocondrial em estudo. A região I (VCP) foi idêntica para todos, a seta em vermelho indica a cisteína peroxidática. (Painel B): Alinhamento das sequências de TXNPx mitocondrial de *L. braziliensis* (PDB número de acesso: 4KB3) e *T. cruzi* (mTcTXNP em estudo). Setas em vermelho indicam os resíduos de D76, D108, S109, S112 e H113; seta em azul, a cisteína peroxidática ativa presente na alça constituída pelos resíduos VCPTE; asterisco (*), as posições de resíduos conservados; dois pontos (:), conservação entre grupos de forte propriedade similares; um ponto (.), conservação entre grupos de baixa propriedades similares; traço (-), gap na sequência.



Fonte: Autor.

Figura 44: Alinhamento múltiplo de triparedoxina peroxidase mitocondrial de *T. cruzi* com a de outros tripanosomatídeos. A região I (VCP) apresenta resíduos conservados entre os organismos. A seta em vermelho indica o resíduo de cisteína ativo; asterisco (*) indica posições de resíduos conservados; dois pontos (:) indica conservação entre grupos de forte propriedade similares; um ponto (.) indica conservação entre grupos de baixa propriedades similares; traço (-) indica gap na sequência.

C.brachyrhynchus	-----
R.catesbeiana	-----
L.amazonensis	-----
T.brucei	-----
T.cruzi-Y	-----
T.cruzi-CL	-----
T.cruzi-Dm28c	MTFKLCMHLLKSKHGRQVRVEIHATVVGGMNDVNNEINLVIFCIYLFSLSIFFFLYFIL
C.brachyrhynchus	-----
R.catesbeiana	-----VIRAAAAPVSRVQCPVIAGASTGR
L.amazonensis	-----MLRRLSTSCFLKRAQFR
T.brucei	-----MLRRFSMLPLSGGIARR
T.cruzi-Y	-----MFFRMAVTSLQKGLSRR
T.cruzi-CL	-----MFFRMAVTSLQKGLSRR
T.cruzi-Dm28c	ISFSGRSCHHKRQKTLTEIKKKEKKKSSPRSQKKKTHKKS FVMFFRMAVTSLQKGLSRR
C.brachyrhynchus	-----RFAAAVTQHAPSFKGTAVVNGEFKELSLDDFKGKYLVLFFYP
R.catesbeiana	AVFCANPKFNSTSSSRLLPAVTQLAPQFKGTAVVNGEFKDLSDDFKGKYLVLFFYP
L.amazonensis	GFAATSPLLNLNDYQM-YRTATVREAAPQFSGKAVVNGAIKDINMNDYKGKYLVLFFYP
T.brucei	SFFRTAPLFNLNDYQA-YRTATVREAAPEFAGKAVVDGKIKDISMNDYKGKYLVLFFYP
T.cruzi-Y	AFCNTPRLNLNDYQA-YKTATVREAAPEWAGKAVVNGKIQDISLNDYKGKYLVLFFYP
T.cruzi-CL	AFCNTPRLNLNDYQA-YKTATVREAAPEWAGKAVVNGKIQDISLNDYKGKYLVLFFYP
T.cruzi-Dm28c	AFCNTLRLNLNDYQA-YKTATVREAAPEWAGKAVVNGKIQDISLNDYKGKYLVLFFYP
	: * : * * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
C.brachyrhynchus	FTFVCPTEIVAFSNKANEFRDNCVAVSVDSHFSLAWINTPRKSGGLGKMNI PVLS
R.catesbeiana	FTFVCPTEIVAFSDKANEFHDVNCVAVSVDSHFCHLAWNTPRKSGGLGHMNI PLLS
L.amazonensis	FTFVCPTEIIAFSDRHADFELNTQVAVSCDSVYSHLAWNTPRKKGGLGEMHI PVLAD
T.brucei	FTFVCPTEIVSFSDSHAEFEKLNTQVAVSCDSHFSLAWVETPRKKGGLGEMKI PLLS
T.cruzi-Y	FTFVCPTEITAFSDAQAEFDKINTQVAVSCDSQYSHLAWINTPRNKGGLGEMSI PVLS
T.cruzi-CL	FTFVCPTEITAFSDAQAEFDKINTQVAVSCDSQYSHLAWINTPRNKGGLGEMSI PVLS
T.cruzi-Dm28c	FTFVCPTEITAFSDAQAEFDKINTQVAVSCDSQYSHLAWINTPRNKGGLGEMSI PVLS
	***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
C.brachyrhynchus	LTKQISRDYGVLLGPGIALRGLFIIDPNGIIKHLVNDLPVGRSVEETLRLVKAFQFVE
R.catesbeiana	LTKQISRDYGVLLNPGIALRGLFLIDPNGIVRHMSVNDLPVGRSVEETLRLVKAFQYVE
L.amazonensis	KSMEIARDYGVLLIEESGIALRGLFIIDKKGILRHSTINDLPVGRNVDEALRVLEAFQYAD
T.brucei	FTKEISRDYGVLLVEEQGLSLRALFVIDDKGILRHVTINDLPVGRNVDEVLRVQAFQYAD
T.cruzi-Y	LTKENCPLWSF-----
T.cruzi-CL	LTKEIARDYGVLLIEEQGISLRGLFIIDDKGILRHITVNDLPVGRNVEEVLRVVQAFQYVD
T.cruzi-Dm28c	LTKEIARDYGVLLIEEQGISLRGLFIIDDKGILRHITVNDLPVGRNVEEVLRVVQAFQYVD
	: : . : :
C.brachyrhynchus	THGEVCPANWTPDSPTIKPSPEGSKEYFEKVHK
R.catesbeiana	THGEVCPANWTPHAPTIKPSPEGSKEYFNKVN-
L.amazonensis	ENGDAIPCGWKPGQPTLDTT--KAGEFFEKNM-
T.brucei	KTGDVIPCWNKPGKETMKVE--AAKEYFEKNL-
T.cruzi-Y	-----
T.cruzi-CL	KNGDVIPCWNRPKPTMKTE--KANEYFEKNA-
T.cruzi-Dm28c	KNGDVIPCWNRPKPTMKTE--KANEYFEKNA-

Fonte: Autor.

A predição de estrutura secundária através de Phyre2 (KELLEY et al., 2015): *Protein Homology Y Recognition Engine V 2.0* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), demonstrou que mTcTXNPx apresenta hélices- α e dobras- β (Figura 45).

Figura 45: Alinhamento de triperoxidase. A predição das estruturas secundárias de mTcTXNPx de *T. cruzi* foi realizada a partir do molde conhecido de TXNPx de humano (PDB número de acesso: 3TKP). Estão representadas em verde, as hélices- α ; em azul, as dobras- β ; quadros em cinza, os resíduos idênticos. Os resíduos coloridos são para facilitar a visualização.



Fonte: Autor.

As enzimas mTcTXNPx e cTcTXNPx apresentam domínio característico da família peroxiredoxina, ambos conservam os resíduos cisteínas, 2-Cys, de atividade peroxidase. A forma mitocondrial (mTcTXNPx) apresenta o resíduo Cys entre Val-Cys-Pro (região I: VCP) e Val-Ile-Pro-Cys (região II: VIPC). A forma citosólica (cTcTXNPx) apresenta as duas regiões sem alterar os resíduos de aminoácidos, ou seja, os dois motivos são VCP (WILKINSON et al., 2000).

A forma mitocondrial de mTcTXNPx estudada neste trabalho, apresenta a mesma região I (VCP). Entretanto, a região II não apresentou-se idêntica ao descrito na literatura (VIPC), porém contém o resíduo Cys, importante para a atividade redutora da enzima. Essa diferença pode ser devido às características da cepa estudada, Y, e aquela disponível no banco de dados, CL-Brener. Ao se comparar as sequências de mTcTXNPx e cTcTXNPx verificou-se que ambas apresentam o motivo VCP na região I. Dado que a forma mitocondrial e citosólica possuem o mesmo motivo na região I, então o epítipo de ambas pode ter sido reconhecido pelo anticorpo policlonal anti mTcTXNPx demonstrado no *Western blotting* (figura 49).

O alinhamento múltiplo da sequência de mTcTXNPx da cepa Y com triparedoxina peroxidase mitocondrial de outras cepas de *T. cruzi*, bem como de outros tripanosomatídeos, *T. brucei* e *Leishmania* spp., demonstrou diferenças na porcentagem de identidade. Essas diferenças entre *T. cruzi* se devem às variações presentes entre cepas e formas do parasito. Em relação a outros tripanosomatídeos, apesar da sequência ter domínio conservado da superfamília tioredoxina com função peroxiredoxina que contém o resíduo de cisteína redutor ativo, a porcentagem de identidade diminui por serem organismos de espécies diferentes. Embora a porcentagem de identidade de triparedoxina peroxidase mitocondrial entre os tripanosomatídeos seja diferente, apresentam a região I (VCP) que contém a cisteína ativa da enzima conservada.

5.3. Análise da expressão de mTcTXNPx

Foram feitas curvas de crescimento para avaliar qual o tempo de tratamento das culturas para a produção de extratos protéicos. A partir de uma cultura com sete dias de crescimento, fase log (1×10^7 parasitos/mL), foi realizado o tratamento com benzonidazol (IC_{50} da cepa Y) e o grupo controle sem benzonidazol; os testes foram feitos em triplicata. A partir de uma cultura inicial (fase log), foram feitas contagens nos intervalos: 24, 48 e 72 horas. Dado que após 48 horas ocorria um decréscimo na viabilidade de *T. cruzi*, então os tratamentos foram até 48 horas. Porém, houve dificuldade em detectar bandas de polipeptídios por *Western blotting*, devido à toxicidade das substâncias. Portanto, padronizou-se que os tratamentos seriam realizados em 6 e 24 horas (KOHATSU, 2013).

Após 6 e 24 horas de tratamentos, com BZFS e BZTS, realizou-se a contagem de *T. cruzi* (Tabela 3) vivos em câmara de Neubauer.

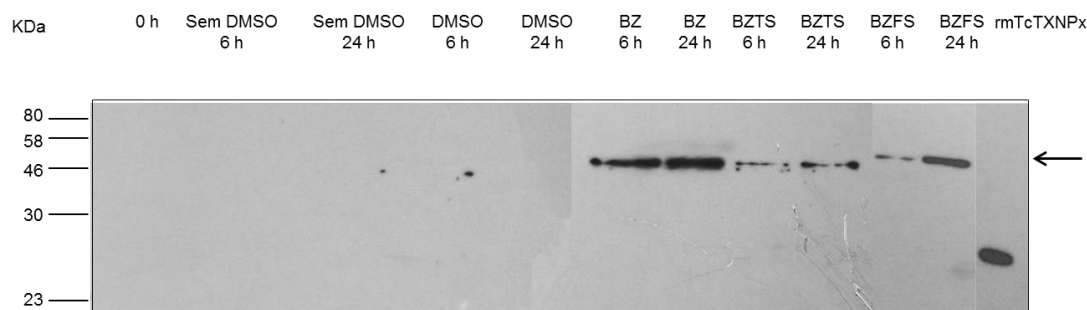
Tabela 3: Contagem de *T. cruzi* após tratamento

	Quantidade de parasitos/mL		
	0 h	6 h	24 h
Sem DMSO	1×10^7	$1,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
DMSO	1×10^7	$1,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
BZ	1×10^7	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
BZFS	1×10^7	$8,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
BZTS	1×10^7	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$

Fonte: Autor.

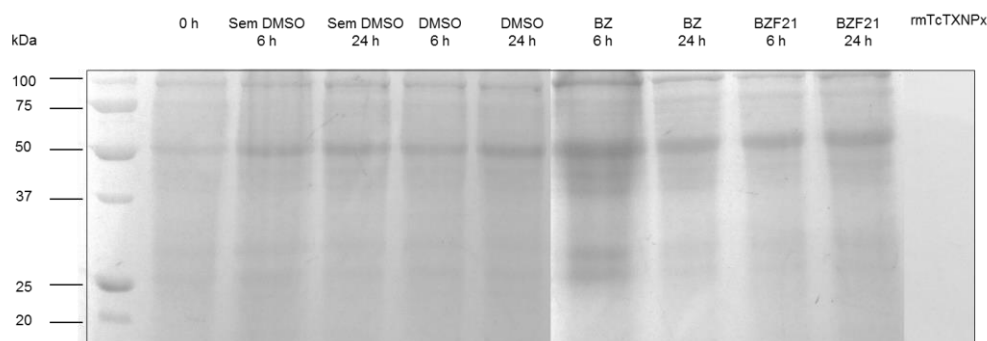
Seguiu-se a lise para a obtenção dos extratos totais não purificados, utilizados para a avaliação da expressão de mTcTXNPx (Figura 46). Foram identificados polipeptídios de tamanho aproximadamente de 58 kDa, nos tratamentos com BZFS e BZTS, bem como benzonidazol. Porém, não houve aumento na expressão de mTcTXNPx de 25,5 kDa. Como controle, a mesma quantidade de extratos (10µg) foi submetida à SDS-PAGE 10% (Figura 47). As substâncias em estudo e o benzonidazol foram diluídos em DMSO, e por isso, também foram feitas culturas em presença e ausência de DMSO, para verificar se interfere na citotoxicidade. Não houve interferência a concentração utilizada que não excedia a 0,05%.

Figura 46: *Western blotting* da avaliação na expressão de mTcTXNPx. Reação do extrato total (10µg) da cepa Y, forma epimastigota de *T. cruzi*, com o anticorpo anti mTcTXNPx (1:400). O h: tempo inicial; BZ: benzonidazol; BZTS e BZFS: derivados benzofuroxânicos; mTcTXNPxrec: mTcTXNPx recombinante. A seta indica os polipeptídios de aproximadamente 58 kDa detectados pelo anticorpo anti mTcTXNPx. À esquerda, peso molecular ColorPlus™ (BioLabs).



Fonte: Autor.

Figura 47: SDS-PAGE 10 %, corado com 0,1% de *Coomassie brilliant blue* R-250, dos extratos totais (10 µg) de *T. cruzi*. O h: tempo inicial; BZ: benzonidazol; BZTS e BZFS: derivados benzofuroxânicos; mTcTXNPxrec: mTcTXNPx recombinante. À esquerda, peso molecular Precision Plus Protein™ (BioRad).



Fonte: Autor.

Uma indução prévia *in vitro* à resistência ao H₂O₂ demonstrou ser necessária para a cepa Y derivada resistente, forma epimastigota de *T. cruzi*, aumentar a expressão de cTcTXNPx (FINZI et al., 2004). A indução prévia *in vitro* ao benzonidazol demonstrou resultados diferentes na expressão de mTcTXNPx em relação ao teste *in vivo*. Verificou-se que houve aumento na expressão de mTcTXNPx, tamanhos de 50 kDa e próximo a 85 kDa, pela cepa induzida à resistência *in vitro*, entretanto não ocorreu o mesmo naquela induzida *in vivo*. Além do mais entre as cepas naturalmente resistentes ao benzonidazol, nem todas aumentaram a expressão de mTcTXNPx. (NOGUEIRA et al., 2009). No presente estudo não foram realizadas induções prévias à resistência ao H₂O₂ e nem ao benzonidazol, o que pode estar relacionado com o não aumento na expressão de mTcTXNPx de 25,5 kDa.

Interessante que em testes com camundongos ocorreu essa variação no nível de expressão de mTcTXNPx e cTcTXNPx, decorrência da heterogeneidade entre as cepas de *T. cruzi*. As cepas foram classificadas como virulentas devido ao nível de parasitemia e lesões no tecido cardíaco. As cepas mais virulentas aumentaram a expressão de mTcTXNPx e cTcTXNPx em relação às atenuadas. Apesar das atenuadas expressarem mTcTXNPx e cTcTXNPx, no caso da cepa Y essas enzimas não foram detectadas (PIACENZA et al., 2009a).

Dados de estudo com pacientes mostraram a dificuldade em avaliar a resistência e a suscetibilidade das cepas. Com base na correlação da atividade de benzonidazol *in vivo* (porcentagens da taxa de cura em camundongos) e *in vitro* (concentrações de IC₅₀), as cepas de *T. cruzi* foram separadas em suscetíveis (IC₅₀ de 13,3 ± 4,5 µM) e resistentes (IC₅₀ de 28 ±

4,4 μ M) ao benzonidazol. Nesse estudo não foi possível fazer essa correlação com os pacientes, antes e após o tratamento com benzonidazol. Os valores de IC₅₀ variaram antes e após o tratamento sem seguir o padrão de suscetível e resistente. Em um grupo, o IC₅₀ praticamente não variou antes e após o tratamento; no outro, aumentou em duas vezes e em outro, houve grande decréscimo. Entre os pacientes que foram considerados curados, estavam aqueles do grupo da cepa resistente. Alguns dos que não foram considerados curados estavam no grupo da cepa suscetível, o que demonstra que a terapêutica depende da suscetibilidade da cepa ao benzonidazol, acesso ao benzonidazol aos diferentes tecidos e a resposta imunológica do hospedeiro (MORENO et al., 2010).

Foi descrito por Gadelha et al. (2013) que cTcTXNPx é liberado para o meio extracelular, apesar da sequência dessa proteína não apresentar peptídio sinalizador para secreção. Por isso, não houve decréscimo na expressão de cTcTXNPx, o que ocorreu é que foi secretado para o meio. O motivo de secretar cTcTXNPx é incerto, acredita-se que seja para minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio presentes no meio, e com isso evitar o aumento da concentração dessas no interior de *T. cruzi*. Essa atividade é encontrada em *Leishmania*, que secreta proteínas de atividades proteolíticas e antioxidativas, como triparedoxina peroxidase, superóxido dismutase, tripanotona redutase e provável glutatona com atividade peroxidase.

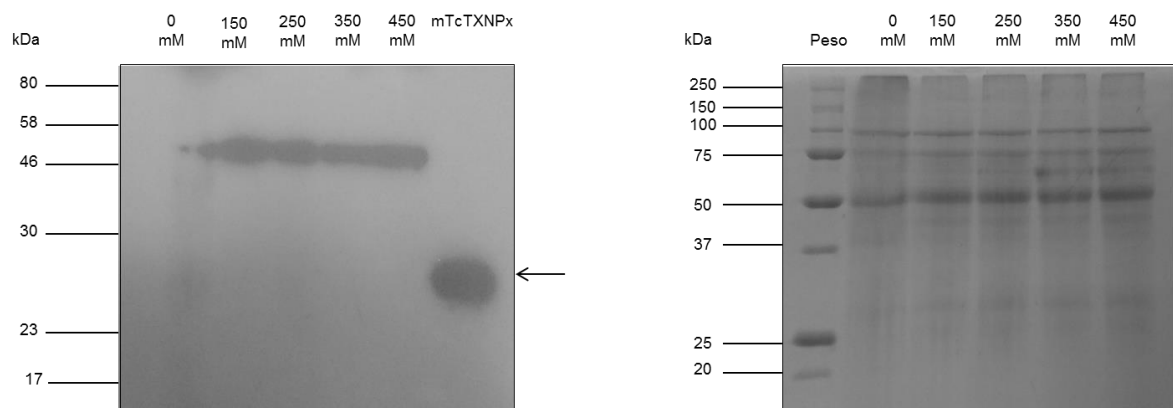
No presente estudo não se realizou as avaliações de mTcTXNPx nos meios de cultura para verificar se o mesmo descrito por Gadelha et al. (2013) ocorreria, ou seja, secreção da proteína para o meio de cultura, o que também pode justificar a dificuldade de detecção do polipeptídio de 25,5 kDa nos extratos protéicos dos parasitos.

5.4. Avaliação da condição redutora por DTT ou 2-mercaptoetanol

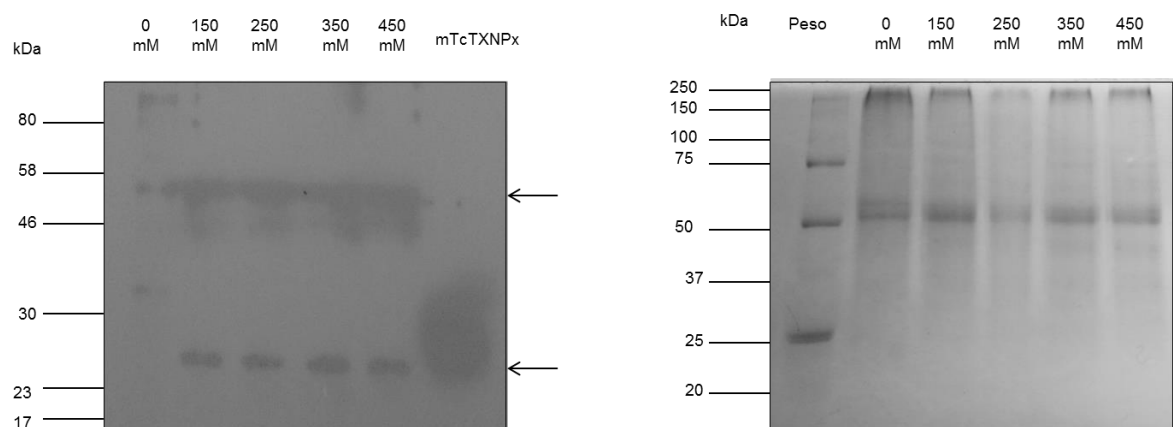
Para a avaliação dos agentes redutores foi utilizada cultura tratada apenas com BZTS, visto a disponibilidade em estoque dessa substância. Os extratos totais não purificados em condição redutora mantida com DTT, formaram polipeptídeos de tamanho entre 46 kDa e 58 kDa. Nos extratos em presença de 2-mercaptoetanol foram visualizados os mesmos polipeptídios e mais o de 25,5 kDa, correspondente ao monômero de mTcTXNPx, conforme observado na proteína recombinante mTcTXNPx. Na ausência de 2-mercaptoetanol notou-se que não ocorreu a formação do monômero (Figura 48).

Figura 48: *Western blotting*, à esquerda, da reação do anticorpo anti mTcTXNPx (1:400) com os extratos totais (10 µg/poço) da cepa Y de *T. cruzi*, incubados em diferentes concentrações de agentes redutores. SDS-PAGE 10% corado com 0,1% de *Coomassie brilliant blue* R-250, à direita, dos mesmos extratos totais. (A) DTT. (B) 2-mercaptoetanol. mTcTXNPxrec: mTcTXNPx recombinante de 25,5 kDa. As setas indicam os monômeros e dímeros de mTcTXNPx. Peso molecular ColorPlus™ (BioLabs), à esquerda; peso molecular Precision Plus Protein™ (BioRad), à direita.

A



B



Fonte: Autor.

Em teste para detectar a presença de imunoglobulina G (IgG) para *Brucella*, causador de brucelose, é utilizado 2-mercaptoetanol no teste de aglutinação. Utiliza-se 2-mercaptoetanol para romper as ligações dissulfeto da imunoglobulina M (IgM), sua aglutinação é inibida, e ocorre a aglutinação de IgG em soro bovino. A substituição de 2-mercaptoetanol por DTT não apresentou a mesma resposta, pois demonstrou ser menos sensível (MCMAHON, 1983). A proteína antioxidante tiol específica (ATS) de *Saccharomyces cerevisiae* apresenta cisteínas redutoras. Em condição redutora mantida por 2-

mercaptoetanol, essa proteína formou polipeptídio referente ao monômero de ATS. Na ausência de 2-mercaptoetanol havia polipeptídio de tamanho maior que foi identificado como o dímero de ATS (CHAE et al., 1994). A presença de 2-mercaptoetanol também foi necessária para a formação dos monômeros de mTcTXNPx e cTcTXNPx. Na ausência desse agente redutor, formaram-se as ligações dissulfetos, constatadas pela presença dos dímeros (WILKINSON et al., 2000).

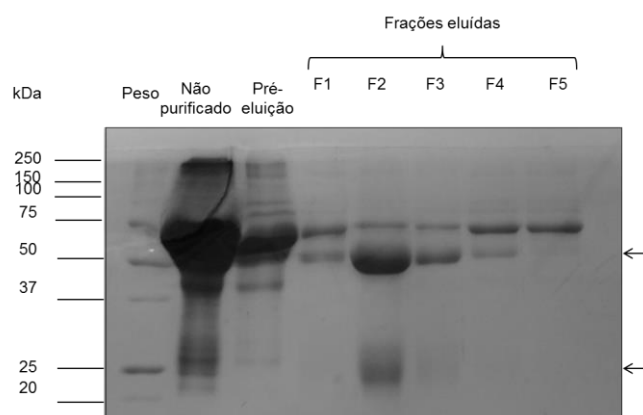
Os polipeptídios detectados por *Western blotting* apresentaram tamanho entre 46 e 58 kDa. Dado que mTcTXNPx apresenta isoformas, então realizou-se os testes nas condições redutoras com 2-mercaptoetanol e DTT para verificar a presença do monômero de mTcTXNPx e desse modo comparar se esses dois agentes redutores apresentam diferença em romper a ligação dissulfeto entre monômeros que se associam em formação dimérica. O teste demonstrou que 2-mercaptoetanol foi mais eficiente que DTT em romper as ligações dissulfeto, constatado na detecção dos monômeros pelo anticorpo anti mTcTXNPx. Além do mais é um método mais econômico e rápido de avaliar a presença de isoformas, desde que se tenha o anticorpo da proteína em estudo, como foi neste caso.

No estudo de Guerrero et al. (2000) a forma dimérica de cTcTXNPx de aproximadamente 40 kDa, do monômero de aproximadamente 23 kDa, foi encontrada mesmo em condição redutora mantida por DTT (GUERRERO et al., 2000). O mesmo ocorreu no estudo de Piñeyro et al. (2011), porém para a forma mitocondrial ao invés de citosólica, a forma dimérica de mTcTXNPx de aproximadamente 56 kDa, do monômero de aproximadamente 28 kDa (PIÑEYRO et al., 2011). Porém no presente estudo foi necessário o uso de 2-mercaptoetanol ao invés de DTT para avaliar a presença de monômero de mTcTXNPx.

5.5. Purificação do anticorpo anti mTcTXNPx

As frações eluídas da coluna com proteína A foram quantificadas, leitura a 280 e 595 nm. Realizaram-se duas quantificações para obter as médias das concentrações, pois os resíduos de aminoácidos detectados são diferentes nesses comprimentos de ondas. A confirmação da purificação da IgG policlonal anti mTcTXNPx, produzida em coelho, foi avaliada por meio de SDS-PAGE 10% (Figura 49). Em condição redutora ocorre a formação de dois fragmentos de polipeptídios de 25 kDa e 50 kDa, como esperado (EIVASI et al., 2015).

Figura 49: SDS-PAGE 10%, corado com 0,1% *Coomassie brilliant blue* R-250, da purificação do anticorpo anti mTcTXNPx (5 µg) por cromatografia de afinidade com proteína A. As setas indicam os polipeptídios de 25 (cadeia leve) e 50 kDa (cadeia pesada). À esquerda, peso molecular Precision Plus Protein™ (BioRad).



Fonte: Autor.

As condições empregadas na purificação do anticorpo IgG demonstraram-se adequadas; foram utilizados 250 mg de proteína A ao invés de 1000 mg como recomendado pelo fabricante. Nas condições utilizadas, a técnica demonstrou ser suficiente para baixo volume de purificação com rendimento de 500 µL (3,3 mg/mL) de anticorpo a partir de 750 µL de soro total.

5.6. Confirmação da reatividade do anticorpo anti mTcTXNPx purificado

O anticorpo, fração F2 de IgG purificada (concentração 5,3 mg/mL), foi empregado em *Western blotting* para detectar mTcTXNPx presente nos extratos totais não purificados provenientes de *T. cruzi*. Para comparação, foi utilizado o anticorpo total não purificado (Figura 50). Os polipeptídios detectados pelo anticorpo anti mTcTXNPx purificado estão descritos na Tabela 4, comparados com cTcTXNPx.

Tabela 4: Tamanhos de triparedoxina peroxidase mitocondrial (mTcTXNPx) e citosólica (cTcTXNPx) de *T. cruzi*

Poli-peptídios detectados no estudo	mTcTXNPx	cTcTXNPx
23 kDa		21 kDa ^c 23 kDa ^{b,d,e}
25 kDa	25 kDa ^{a,f} 26 kDa ^e	25 kDa ^{a,e,f}
~ 30 kDa	28 kDa ^g	
~ 46 kDa	50 kDa ^{a,f}	40 kDa ^b 46 kDa ^f 47 kDa ^b
~ 58 kDa	56 kDa ^g	50 kDa ^{a,d,f}
~ 80 kDa	85 kDa ^e	113 kDa ^d

a: Wilkinson et al., 2000.

b: Guerrero et al., 2000.

c: Finzi et al., 2004.

d: Piñeyro et al., 2005.

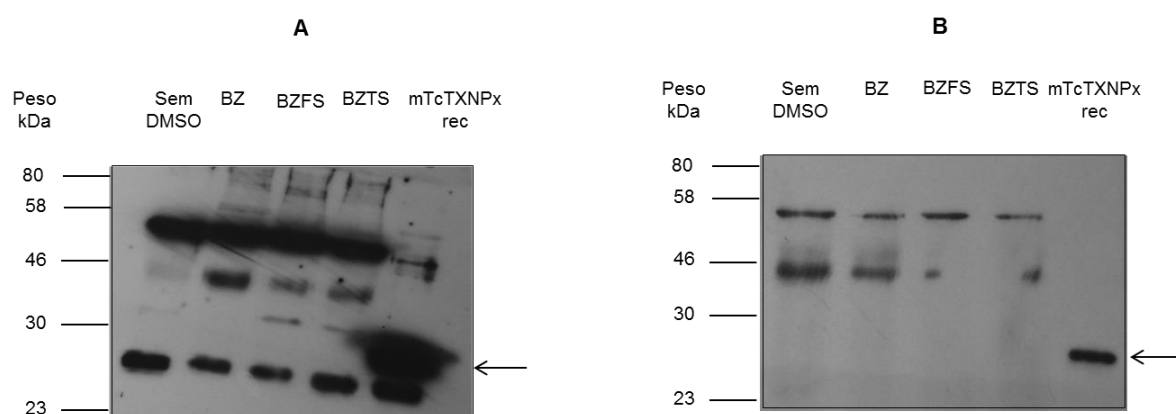
e: Piñeyro et al., 2008

f: Nogueira et al., 2009.

g: Piñeyro et al., 2011.

Fonte: Autor

Figura 50: Western blotting dos extratos totais (10 µg) da cepa Y de *T. cruzi* incubados com anticorpo anti mTcTXNPx (1:400). (A) Não purificado e (B) Purificado. As setas indicam a proteína recombinante mTcTXNPx de 25,5 kDa. À esquerda, peso molecular ColorPlus™ (BioLabs).



Fonte: Autor.

A enzima mTcTXNPx em *T. cruzi* ocorre na forma monomérica que ao se ligar produz a isoforma dimérica (WILKINSON et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2009; PIÑEYRO et al.,

2011). A forma mitocondrial monomérica ocorre nos tamanhos de 25 kDa (WILKINSON et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2009), 26 kDa (PIÑEYRO et al., 2008) e 28 kDa (PIÑEYRO et al., 2011), enquanto a dimérica tem 50 kDa (WILKINSON et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2009) e 56 kDa (PIÑEYRO et al., 2011) e trímero de 85 kDa (NOGUEIRA et al., 2009). A forma citosólica monomérica pode ocorrer nos tamanhos de 21 kDa (FINZI et al., 2004), 23 kDa (NOGUEIRA et al., 2009), 25 kDa (PIÑEYRO et al., 2008) e 28 kDa (PIÑEYRO et al., 2011), enquanto os dímeros tem 46 kDa (NOGUEIRA et al., 2009), 50 kDa (WILKINSON et al., 2000; PIÑEYRO et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2009) e 56 kDa (PIÑEYRO et al., 2011). A forma citosólica já foi descrita em associação tetramérica de 113 kDa (PIÑEYRO et al., 2005). A população de *T. cruzi* é muito diversificada (ZINGALES et al., 2012) o que pode explicar essas diferenças nos tamanhos de mTcTXNPx e cTcTXNPx.

No presente trabalho, o anticorpo IgG purificado detectou polipeptídios de aproximadamente 46 kDa e 58 kDa presentes nos extratos totais de *T. cruzi*, tratados com as substâncias nas suas respectivas concentrações IC₅₀. Após a purificação de anticorpo IgG, não foram detectados os polipeptídios das possíveis formas mitocondrial de mTcTXNPx, de tamanhos aproximados a 30 kDa e 80 kDa; bem como da suposta forma citosólica da enzima de 23 kDa. O anticorpo policlonal não purificado pode ter reconhecido o polipeptídio da forma citosólica de TXNPx, uma vez que conserva o resíduo cisteína (VCP) responsável pela atividade redutora da enzima.

Em *L. infantum* foram detectados monômeros de TXNPx mitocondrial de 27 kDa, associações de dímeros de 270 kDa e 310 kDa e agregados superiores a 450 kDa (CASTRO et al., 2002). Em outro estudo com *L. infantum*, foram encontrados dímeros de TXNPx mitocondrial de 46 kDa e estruturas quaternárias decaméricas de 230 kDa (TEIXEIRA et al., 2015). Isso ocorre uma vez que TXNPx, típica 2-Cys, pode assumir distintos estados oligoméricos, dímeros, decâmeros e oligômeros de alto peso molecular. A superoxidação da cisteína peroxidática tem sido relacionada com a alteração de função peroxidase e aumentar a atividade chaperona, ao estabilizar oligômeros maiores que decâmeros (MORAIS et al., 2017).

Íons divalentes Ca⁺² e/ou Mg⁺², presentes em tampões que contenham CaCl₂ e MgCl₂, respectivamente, afetam a estrutura quaternária e a função de TXNPx mitocondrial em *L. infantum*. Em pH fisiológico, teste *in vitro*, TXNPx mitocondrial de *L. infantum* altera da forma dimérica para a decamérica na presença desses íons. Estimulam a atividade peroxidase e contribuem para manter a função chaperona. O decâmero é formado quando cinco homodímeros se ligam ao outro via interface tipo A. O efeito de Ca⁺² e/ou Mg⁺² na

estabilização do decâmero está relacionado com a ligação na interface A e a concomitante estabilização da região que contém a alça com a cisteína peroxidática. A ligação desses íons ocorre numa região com cavidade carregada negativamente constituída por Asp 76 (D 76), Asp 108 (D 108), Ser 109 (S 109), Ser 112 (S 112) e His 113 (H113) que demonstraram ser essenciais para a formação e estabilização do decâmero (MORAIS et al., 2017).

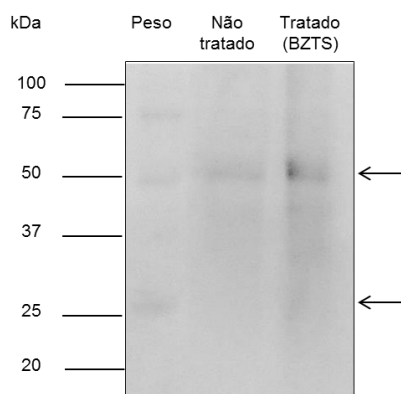
Segundo Morais et al., (2017), durante o estresse térmico, fase de transição do hospedeiro inseto para o hospedeiro mamífero, ocorre um aumento de Ca^{+2} na mitocôndria, com isso o decâmero de TXNPx mitocondrial de *L. infantum* oxidado passa a função de chaperona. Além do estímulo pelo Ca^{+2} na mitocôndria, o aumento desse íon no citosol faz ocorrer decréscimo no pH mitocondrial, outro estímulo para que TXNPx assuma a forma decamérica (MORAIS et al., 2017).

Visto que em *L. infantum* a superoxidação da cisteína peroxidática de TXNPx mitocondrial, responsável pela atividade redutora de peróxidos, ocasiona a formação de decâmeros e oligopeptídios maiores que os decâmeros, o mesmo poderia ocorrer com mTcTXNPx de *T. cruzi*, uma vez que apresentam os resíduos conservados (D 76, D 108, S109, S 112 e H113), relacionados com a estabilização da estrutura decamérica. Além do mais, dado que o tampão de lise contém MgCl_2 , então o íon divalente Mg^{+2} poderia influenciar na formação de oligômeros de mTcTXNPx, por isso a presença de polipeptídios maiores, tamanhos aproximadamente de 46 kDa, 58 kDa e 80 kDa, que a forma monomérica de 25,5 kDa detectados por *Western blotting*; então, a formação de oligômeros estáveis, devido a ligação de íons divalentes, como Ca^{+2} ou Mg^{+2} à TXNPx mitocondrial, que ocorre em *L. infantum* aconteceria para *T. cruzi*.

5.7. Purificação de extrato total

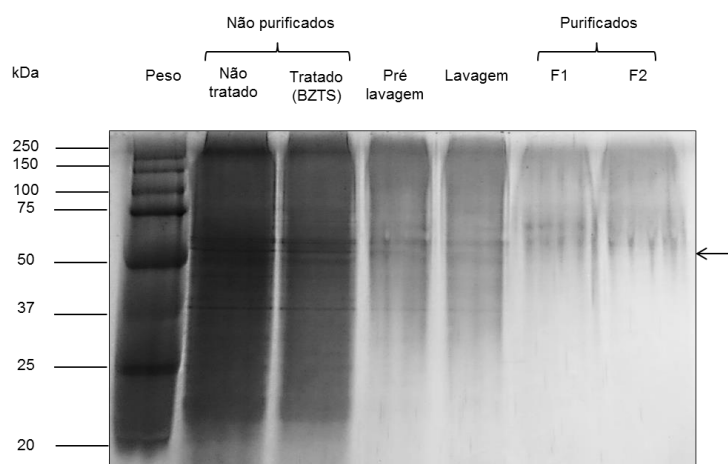
A partir das culturas, tratadas e não com BZTS, foram obtidos os extratos totais (Figura 51). O extrato total proveniente da cultura tratada com BZTS foi purificado por cromatografia de afinidade, na qual o ligante foi IgG purificada (fração F2, concentração 5,3 mg/mL). A confirmação da obtenção dos extratos totais foi por SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Blue* R-250. Para a confirmação da purificação da proteína nos extratos totais foi feito *Western blotting*, com o anticorpo IgG purificado (fração F3). Houve dificuldade na detecção de bandas referentes aos polipeptídios de mTcTXNPx, devido a baixa concentração dos mesmos nos extratos. Realizou-se um gel SDS-PAGE 10% corado com AgNO_3 para avaliar as bandas dos polipeptídios purificados por cromatografia de afinidade (Figura 52).

Figura 51: SDS-PAGE 10%, corado com 0,1% *Coomassie Blue* R-250, dos extratos totais protéicos (10 µg). As setas indicam o monômero e o dímero de mTcTXNPx. À esquerda, peso molecular Precision Plus Protein™ (BioRad).



Fonte: Autor.

Figura 52: SDS-PAGE 10%, corado com 12 mM AgNO_3 , da purificação do extrato total (2,5 µg) por cromatografia de afinidade com CNBr^{TM} (GE Healthcare). A seta indica o polipeptídio de aproximadamente 58 kDa. À esquerda, peso molecular Precision Plus Protein™ (BioRad).



Fonte: Autor.

O anticorpo IgG purificado foi utilizado na purificação de extrato total, tal qual ocorreu com a purificação de IgG, o volume de extrato total purificado obtido foi de 500 µL (436 µg/mL) a partir de 1 mL (2201,95 µg/mL) extrato total não purificado. Por isso, esse tipo de purificação é ideal para purificação de baixas quantidades de amostras. Dado que a fração F2 (5,3 mg/mL) de anticorpo IgG purificado foi empregada para a purificação do extrato total, então para a confirmação da purificação desse extrato foi utilizada a fração F3 (1,8 mg/mL), como essa fração continha baixa concentração de IgG purificada (3 vezes

menos concentrada), por isso não foi possível a detecção de polipeptídios referentes a mTcTXNPx. Por isso, foi realizado SDS-PAGE 10% corado com 12 mM de AgNO₃, a partir do qual foi detectado o polipeptídio de mTcTXNPx, na forma dimérica, de aproximadamente 58 kDa.

Além de proteínas que auxiliam na resistência ao benzonidazol, como triparedoxina peroxidase (ANDRADE et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2009; KOHATSU, 2013), superóxido dismutase (NOGUEIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008) e *old yellow enzyme* (MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008), a perda de genes que codificam nitroreductase (TcNTR) tem sido relacionada com a resistência ao benzonidazol. Também existem cepas naturalmente resistentes que não perdem TcNTR (CAMPOS et al., 2014).

A forma decamérica, independente do estado redox da célula, é necessária para a proteção de TXNPx mitocondrial contra o choque térmico, além de ser vital para o estabelecimento da infecção de *L. infantum* no mamífero hospedeiro, por isso a busca por compostos que previnam a decamerização poderiam ser estudados, por inibirem a função chaperona dessa enzima (MORAIS et al., 2017).

Distintos mecanismos, além da expressão de mTcTXNPx, podem estar envolvidos na resistência a agentes oxidantes pelo *T. cruzi*, que apresenta diversidade em evadir o ambiente adverso produzido pelo hospedeiro devido às espécies reativas de oxigênio. Essa plasticidade em adaptar-se aos variados ambientes é auxiliada pela variação genética e a existência de cepas naturalmente resistentes. Os derivados benzofuroxânicos, BZFS e BZTS, são inéditos e apresentaram-se promissores na atividade anti *T. cruzi*, potenciais moléculas a mais estudos para o tratamento da doença de Chagas. Essas substâncias apresentaram concentrações IC₅₀ próximas a de benzonidazol e foram seguras para célula de mamífero HepG2.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- No presente estudo, derivados benzofuroxânicos, BZTS e BZFS, demonstraram ser promissoras substâncias com atividade tripanossomicida, demonstraram-se tóxicas para *T. cruzi*, porém não para modelo de célula de mamífero HepG2. O átomo de enxofre ao invés de oxigênio parece ser o responsável pela substância BZTS ser mais tóxica que BZFS;

- 2-mercaptoetanol, como agente redutor, demonstrou ser melhor que DTT em quebrar a ligação dissulfeto entre dímeros e foi essencial para detectar a presença do monômero de mTcTXNPx;

- Os polipeptídios de tamanhos diferentes ao monômero de 25,5 kDa, presentes nos extratos totais protéicos não purificados, detectados pelo anticorpo anti mTcTXNPx não purificado, podem ser as isoformas de mTcTXPx, bem como da forma cTcTXNPx, pois a forma mitocondrial e citosólica apresentam o resíduo de cisteína ativa em seus dois domínios;

- Os polipeptídios de tamanhos superiores ao dímero podem ser trímero ou decâmero de mTcTXNPx, uma vez que íons divalentes Mg^{+2} tendem a fazer com que dímeros se associem em decâmeros estáveis, e em condições de estresse a enzima passa da função de peroxidase para chaperona; além do mais, *T. cruzi* apresenta resíduos conservados (D76, D108, S109 e H113) responsáveis pela formação de decâmeros;

- A partir do extrato total protéico, proveniente de *T. cruzi* tratado com BZTS, purificado por cromatografia de afinidade, na qual o ligante foi o anticorpo IgG purificado, foi detectado polipeptídio de aproximadamente 58 kDa;

- O aumento na expressão de mTcTXNPx de 25,5 kDa não foi detectado após o tratamento da cepa Y de *T. cruzi* com BZTS, porém notou-se a presença de polipeptídio de aproximadamente 58 kDa, forma dimérica, em extrato total protéico purificado;

- Mais estudos sobre a citotoxicidade das substâncias *in vivo* são necessários, bem como a busca por alvos mais específicos para dessas substâncias, por isso a importância de se encontrar ligantes que alterem a atividade enzimática de mTcTXNPx.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADEN, D. P.; FOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B.B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature**, v. 282, p. 615-616, 1979.
- AGUIAR, P. H. N.; FURTADO, C.; REPOLÊS, B. M.; RIBEIRO, G. A.; MENDES, I. C.; PELOSO, E. F.; GADELHA, F. R.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; PENA, S. D. J.; TEIXEIRA, S. M. R.; VIEIRA, L. Q.; GUARNERI, A. A.; ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 07, p. e2279, 2013.
- ALSFORD, S.; KELLY, J. M.; BAKER, N.; HORN, D. Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. **Parasitology**, v. 140, p.1478-1491, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMANL, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- 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.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for na old neglected disease. **PLOS: Neglected Tropical Diseases**, v. 08, p. 01-10, 2014.
- ANDRÉO, R.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; TANSINI, A.; SILVA, D. H. S. CICARELLI, R. M. B. Toxicity and loss of mitochondrial membrane potential induced by alkyl gallates in *Trypanosoma cruzi*. **International Scholarly Research Notices**, v. 2015, p. 01-07, 2015.
- ANGELUCCI, F.; MIELE, A. E.; ARDINI, M.; BOUMIS, G.; SACCOCCIA, F.; BELLELLI, A. Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: Several physiological roles for a potential chemotherapy target. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 206, p. 02-12, 2016.
- ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV – Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. **Biophysical Reviews**, v. 08, p. 163-177, 2016.
- ARNOSTI, L. V. **Reação de trans-splicing in vitro utilizando extrato nuclear livre de células e sequência parcial de alfa tubulina de *Trypanosoma cruzi***. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Instituto de Química, Araraquara, 2011.

- BARBOSA, C. F.; OKUDA, E. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. M. B. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 33-39, 2007.
- BARTHOLOMEU, D. C.; DE PAIVA, R. M. C.; MENDES, T. A. O.; DA ROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. R. Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites. **PLOS Pathogens**, v. 10, p. 01-08, 2014.
- 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.
- BENÍTEZ, D.; CASANOVA, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Initial studies on mechanism of action and cell death of active N-oxide-containing heterocycles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. **Parasitology**, v. 141, p. 682-696, 2014.
- BERN, C. Chagas disease in the immunosuppressed host. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 450-457, 2012.
- BLUMENSTIEL, K.; SCHÖNECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 1791-1799, 1999.
- BRADY, P. N.; MACNAUGHTAN, M. A. Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: biases and mechanistic insights. **Analytical Biochemistry**, v. 491, p. 43-51, 2015.
- BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1736-1745, 2010.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **The American Journal Of Pathology**, v. 185, p. 1537-1547, 2015.
- 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 - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.

- CAMPOS, M. C. O.; LEON, L. L.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, p. 17-19, 2014.
- CASTRO, H.; BUDDE, H.; FLOHÉ, L.; HOFMANN, B.; LÜNSDORF, H.; WISSING, J.; TOMÁS, A. M. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. **Free Radical and Biology and Medicine**, v. 33, p. 1563-1574, 2002.
- CASTRO, H.; TOMAS, A. M. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, p. 1593-1606, 2008.
- CHAE, H. Z.; UHM, T. B.; RHEE, S. G. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 91, p. 7022-7026, 1994.
- CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZA, 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.
- CHIARI, B. G.; MARTINI, P. C.; MORAES, J. D . D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M.A.; CICARELLI, 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.
- CHUGUNOVA, E. A.; VOLOSHINA, A. D.; MUKHAMATDINOVA, R. E.; SERKOV, I. V.; PROSHIN, A. N.; GIBADULLINA, E. M.; BURILOV, A. R.; KULIK, N. V.; ZOBOV, V. V.; KRIVOLAPOV, D. B.; DOBRYNIN, A. B.; GOUMONT, R. The study of the biological activity of amino-substituted benzofuroxans. **Letters in Drug Design And Discovery**, v. 11, p. 502-512, 2014.
- CHUNG, M. C.; GUIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4779-4783, 2003.
- CHUNG, M. C.; BOSQUESI, P. L.; DOS SANTOS, J. L. A prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 3515-3526, 2011.
- CICARELLI, R. M. B.; ARNOSTI, L. V.; TREVELIN, C. C.; DA SILVA, M. T. A. Tools for Trans-splicing drug interference evaluation in Kinetoplastid. In: SHAH, M. M. **Parasitology**. INTECH, 2012. cap. 01, p. 01-07

- 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.; 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.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 389-390, 2013.
- CURA, C. I.; LATTES, R.; NAGEL, C.; GIMENEZ, M. J.; BLANES, M.; CALABUIG, E.; IRANZO, A.; BARCAN, L. A.; ANDERS, M.; SCHIJMAN, A. G. Early Molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi* infected donors. **American Journal of Transplantation**, v. 13, p. 3253-3261, 2013.
- 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 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, W.; ATTÍAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, p. 2069-2080, 2009.
- 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.
- DO CAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes: conserved from bactéria to man. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 03, p. 251-261, 2005.
- 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.

- DUMONTEIL, E.; BOTAZZI, M. E.; ZHAN, B.; HEFFERNAN, M. J.; KATHRYN, J.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; ORTEGA, J.; ROSALES, S. P. L.; Y LEE, B.; BACON, K. M.; FLEISCHER, B.; SLINGSBY, B. T.; CRAVIOTO, M. B.; TAPIA-CONYER, R.; HOTEZ, P. J. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. **Experts Review of Vaccines**, v. 11, p. 1-25, 2012.
- DUTRA, L. A.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. A. E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHUNG, M. C.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. A. S.; DOS SANTOS, J. L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 4837-4847, 2014.
- EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v. 130, p. 432-437, 1959.
- EIVAZI, S.; MAJIDI, J.; MALEKI, L. A.; ABDOLALIZADEH, J.; YOUSEFI, M.; AHMADI, M.; DADASHI, S.; MORADI, Z.; ZOLALI, E. Production and Purification of a Polyclonal antibody against purified mouse IgG2b in rabbits towards designing mouse monoclonal isotyping kits. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 109-113, 2015.
- FARIAS, C. F.; MASSAOKA, M. H.; GIROLA, N.; AZEVEDO, R. A.; FERREIRA, A. K.; JORGE, S. D.; TAVARES, L. C.; FIGUEIREDO, C. R.; TRAVASSOS, L. R. Benzofuroxan derivatives N-Br and N-I induce intrinsic apoptosis in melanoma cells by regulating AKT/BIM signaling and display anti metastatic activity in vivo. **BioMedCentral Cancer**, v. 15, p. 807-818, 2015.
- 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.
- FERRÃO, P. M.; d'Avila-Levy, C. M.; ARAUJO-JORGE, T. C.; DEGRAVE, W. M.; GONÇALVES, A. S.; GARZONI, L. R.; LIMA, A. P.; FEIGE, J. J.; BAILLY, S.; MENDONÇA-LIMA, L.; WAGHABI, M. C. Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during *T. cruzi* invasion. **Plos One**, v. 10, p. 1-15, 2015.
- 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.
- GADELHA, F. R.; GONÇALVES, C. C.; MATTOS, E. C.; ALVES, M. J. M.; PIÑEYRO, M. D.; ROBELLO, C.; PELOSO, E. F. Release of the cytosolic trypanothione peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 287-293, 2013.

- GONÇALVES, R. L. S.; BARRETO, R. F. S. M.; POLYCARPO, C. R.; GADELHA, F. R. CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. F. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 651-661, 2011.
- 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.
- GRETES, M. C.; POOLE, L. B.; KARPLUS, A. Peroxiredoxins in parasites. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, p. 608-633, 2012.
- GUERRERO, S. A.; LOPEZ, J. A.; STEINERT, P.; MONTEMARTINI, M.; KALISZ, H. M.; COLLI, W.; SINGH, M.; ALVES, M. J. M.; FLOHÉ, L. His-tagged trypanothione peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 410-414, 2000.
- GUPTA, S.; WAN, X.; ZAGO, M. P.; SELLERS, V. C. M.; SILVA, T. S.; ASSIAH, D.; DHIMAN, M.; NUÑEZ, S.; PETERSEN, J. R.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.; ESTRADA-FRANCO, J. G.; GARG, N. J. Antigenicity and diagnostic potential of vaccine candidates in human Chagas disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-10, 2013.
- 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.
- HALL, A.; KARPLUS, A.; POOLE, L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: structures, mechanisms and functions. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 276, p. 2469-2477, 2009.
- HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 115-123, 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.
- 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.
- HOTEZ, P. J.; PECOUL, B.; RIJAL, S.; BOEHME, C.; AKSOY, S.; MALECELA, M.; TAPIA-CONYER, R.; REEDER, J. C. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 01-14, 2016.

IMAI, K.; MAEDA, T.; SAYAMA, Y.; MIKITA, K.; FUJIKURA, Y.; MISAWA, K.; NAGUMO, M.; IWATA, O.; ONO, T.; KURANE, I.; MIYAHARA, Y.; KAWANA, A.; MIURA, S. Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 146-148, 2014.

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.

JACKSON, Y.; ALIROL, E.; GETAZ, L.; WOLFF, H.; COMBESCURE, C.; CHAPPUIS, F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, p. e69-e75, 2010.

JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 19, p. 212-218, 2014.

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

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.

JAVITT, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. **The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, p. 161-168, 1990.

JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; PASQUALOTO, K. F. M.; ISHII, M.; FERREIRA, A. C.; BERRA, C. M.; BOSCH, R. V.; MARIA, D. A.; TAVARES, L. C. Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 200-214, 2013.

JOVENÉ, C.; CHUGUNOVA, E. A.; GOUMONT, R. The Properties and the use of substituted benzofuroxans in pharmaceutical and medicinal chemistry: a comprehensive review. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1089-1136, 2013.

KOHATSU, A. A. N. **Avaliação das estruturas químicas derivadas de diaminas do ferroceno no metabolismo oxidativo em cepas de *Trypanosoma cruzi***. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas À Farmácia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.

KOHATSU, A. A. N.; SILVA, F. A. J.; FRANCISCO, A. I.; RIMOLDI, A.; DA SILVA, M. T. A.; VARGAS, M. D.; DA ROSA, J. A.; CICARELLI, R. M. B. Differential expression on mitochondrial trypanothione peroxidase (mTcTXNPx) in *Trypanosoma cruzi* after ferrocenyl diamine hydrochlorides treatments. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 21, p. 125-132, 2017.

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.

LEWINSOHN, R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas's disease (American trypanosomiasis). **Journal of Royal Society of Medicine**, v. 74, p. 451-455, 1981.

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.

MACHADO-SILVA, A.; CERQUEIRA, P. G.; GRAZIELLE-SILVA, V.; GADELHA, F. R.; PELOSO, E. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; MACHADO, C. R. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: antioxidante defence and DNA repair pathways. **Mutation Research**, v. 767, p. 8-22, 2016.

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.

MARQUETTE, C. A.; BLUM, L. J. Applications of luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 546-554, 2006.

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.

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.

MCMAHON, K. J. Comparison of the 2-mercaptoethanol and dithiothreitol tests for determining *Brucella* immunoglobulin G agglutinating antibody in bovine serum. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p. 370-372, 1983.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edge sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotalrole of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 01-14, 2014.

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.

- 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.
- MESSENGER, L. A.; LINETH, G.; VANHOVE, M.; HUARANCA, C.; BUSTAMANTE, M.; TORRICO, M.; TORRICO, F.; MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. Ecological host fitting of *Trypanosoma cruzi* TcI in Bolivia: mosaic population structure, hybridization and a role for humans in Andean parasite dispersal. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 2406-2422, 2015.
- MOLINA-GARZA, Z. J.; BAZALDÚA-RODRÍGUEZ, A. F.; QUINTANILLA-LICEA, R.; GALAVIZ-SILVA, L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Tropica**, v. 136, p. 14-18, 2014.
- MORAIS, M. A. B.; GIUSEPPE, P. O.; SOUZA, T. A. C. B.; CASTRO, H.; HONORATO, R. V.; OLIVEIRA, P. S. L.; NETTO, L. E. S.; TOMAS, A. M. MURAKAMI, M. T. Calcium and magnesium ions modulate the oligomeric and function of mitochondrial 2-Cys peroxiredoxins in *Leishmania* parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 7023-7039, 2017.
- MORENO, M.; D'ÁVILA, D. A.; SILVA, M. N.; GALVÃO, L. M. C.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; GONTIJO, E. D.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 918-924, 2010.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.
- 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.
- NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F. S.; BURLEIGH, B. A.; JELICKS, L. A.; SCHERER, P. E.; MUKHERJEE, S.; LISANTI, M. P.; WEISS, L. M.; GARG, N. J.; TANOWITZ, H. B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 634-643, 2012.
- 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 tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitology Research**, v. 104, p. 835-844, 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.
- PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, p. 1-8, 2013.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, p. 01-13, 30 June 2017.
- 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 and Redox Signaling**, v. 20, p. 01-12, 2012.
- PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTÍNEZ, A.; RADI, R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxidant and Redox Signaling**, v. 19, p. 723-734, 2013.
- PINAZO, M. J.; MUÑOZ, J.; POSADA, E.; CHEJADE, P. L.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; DEL CACHO, E.; SOY, D.; GASCON, J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 4896-4899, 2010.
- PINAZO, M. J.; GUERRERO, L.; POSADA, E.; RODRÍGUEZ, E.; SOY, D.; GASCON, J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 390-395, 2013.
- PINAZO, M. J.; THOMAS, M. C.; BUA, J.; PERRONE, A.; SCHIJMAN, A. G.; VIOTTI, R. J.; RAMSEY, J. M.; RIBEIRO, I.; SOSA-ESTANI, S.; LÓPEZ, M. C.; GASCON, J.

Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. **Expert Reviews of Anti-infective Therapy**, v. 12, p. 479-496, 2014.

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 trypanothione 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.

PIÑEYRO, M. D.; ARCARI, T.; ROBELLO, C.; RADI, R.; TRUJILLO, M. Trypanothione peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, p. 287-295, 2011.

POOLE, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 148-157, 2015.

RAJÃO, M. A.; FURTADO, C.; ALVES, C. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; DE 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.; PENNA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; DE 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, p. 309-321, 2014.

RASSI, A.; Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, A.; Jr.; RASSI, A.; DE REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275-291, 2012.

REVELLI, S.; LE PAGE, C.; PIAGGIO, E.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 118, p. 271-277, 1999.

RIBEIRO, A. R.; AMBRÓSIO, D. L.; LIMA, L.; DEL CISTIA, M. L.; ARENAS VELÁSQUEZ, Á. M.; GRAMINHA, M. A. S.; TEIXEIRA, M. M.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. *Trypanosoma cruzi* TCI, TCII, TCIII e TCV isolated from *Triatoma lenti*, *Triatoma melanocephala*, *Triatoma rubrovaria* and *Triatoma sordida* collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 31., 2015/ ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE, 42., 2015, Caxambu, MG, Brazil, Nov 9-11, 2015. p. 181.

RICH, P. R.; MARÉCHAL, A. The mitochondrial respiratory chain. **Essays In Biochemistry**, v. 47, p. 01-23, 2010.

RIMOLDI, A.; ALVES, R. T.; AMBRÓSIO, D. L.; FERNANDES, M. Z. T.; MARTINEZ, I.; DE ARAÚJO, R. F.; CICALLELLI, 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.

ROBERTSON, L. J.; DEVLEESSCHAUWER, B.; DE NOYA, B. A.; GONZÁLEZ, O. N.; TORGERSON, P. R. *Trypanosoma cruzi*: time for international recognition as a foodborne parasite. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 01-06, 2016.

SANTAMARIA, C.; CHATELAIN, E.; JACKSON, Y.; MIAO, Q.; WARD, B. J.; CHAPPUIS, F.; NDAO, M. Serum biomarkers predictive of cure in Chagas disease patients after nifurtimox treatment. **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 14, p. 302-313, 2014.

ŠARLAUSKAS, J.; MILIUKIENĖ, V.; ANUSEVIČIUS, Z.; MISEVIČIENĖ, L.; KRIKŠTOPAITIS, K.; NEMEIKAITĖ-ČENIENĖ, A.; VITĖNIENĖ, I.; ČENAS, N. Redox properties and prooxidant cytotoxicity of benzofuroxans: a comparison with nitrobenzenes. **Chemija**, v. 20, p. 109-115, 2009.

ŠARLAUSKAS, J.; MISEVIČIENĖ, L.; MAROZIENĖ, A.; KARVELIS, L.; STANKEVIČIŪTĖ, J.; KRIKŠTOPAITIS, K.; ČENAS, N.; YANTSEVICH, A.; LAURYNĖNAS, A.; ANUSEVIČIUS, Z. The Study of NADPH-Dependent Flavoenzyme-Catalyzed Reduction of Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole *N*-Oxides (Benzofuroxans). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 23307-23331, 2014.

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.

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.

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

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; McWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 07, p. 01-07, 2011.

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.

SOARES, R.O.A.; ECHEVARRIA, A.; BELLINENY, M. S. S.; PINHO, R. T.; DE LEO, R. M. M.; SEGUINS, W. S.; MACHADO, G. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; LEON, L. L. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agentes anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 381-387, 2011.

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.

SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. Gene Runner Version 3.05, 1994.

STRASEN, J.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER, O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, p. 1-10, 2014.

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, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. **Atlas didático de vida do *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011, p. 03-06.

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.

TEIXEIRA, F.; CASTRO, H.; CRUZ, T.; TSE, E.; KOLDEWEYD, P.; SOUTHWORTH, D. R.; TOMÁS, A. M.; JAKOB, U. Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, p. E612-E624, 2015.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, p. 696-707, 2013.

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.

- VELÁSQUEZ, A. M. A.; FRANCISCO, A. I.; KOHATSU, A. A. N.; SILVA, F. A.; RODRIGUES, D. F.; TEIXEIRA, R. G.; CHIARI, B. G.; DE ALMEIDA, M. G.; ISAAC, V. L.; VARGAS, M. D.; CICARELLI, R. M. B. Synthesis and trypanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1707-1710, 2014.
- 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.
- WASS, J. A. Origin 7.0. **Biotech Software and Internet Report**, v. 3, n. 5/6 p. 130-133, 2002.
- 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.
- WOOD, Z. A.; SCHRÖDER, E.; HARRIS, J. R.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 32-40, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases. 2015a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly epidemiological record**, n. 06, p. 33-44, 2015b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet, updated March 2017. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 14 agosto 2017.
- 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.
- 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.

TABELAS ANEXAS

TABELAS ANEXAS**APÊNDICE A - Porcentagem de células HepG2 viáveis**

Concentração (µg/mL)	% de células vivas DMSO (teste 1)			Média da % de células vivas DMSO (teste 1)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1500	102,1871	98,52431	99,28305	99,99817	1,933294
750	102,9476	98,82891	98,21925	99,99859	2,572059
187,5	107,619	105,6872	95,30516	102,8705	6,622569
93,75	111,9048	109,9526	93,42723	105,0949	10,1515
46,87	111,9048	110,4265	110,3286	110,8866	0,883071
23,43	121,4286	98,10427	107,5117	109,0149	11,73458

Concentração (µg/mL)	% de células vivas DMSO (teste 2)			Média da % de células vivas DMSO (teste 2)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1500	108,071	95,71614	96,205	99,99738	6,996236
750	101,4376	103,8081	94,53	99,9252	4,82037
187,5	101,1697	106,7506	92,06	99,99344	7,415599
93,75	102,05	103,7002	94,2375	99,99589	5,054705
46,87	104,498	107,2605	88,23	99,99617	10,283
23,43	109,7025	103,9804	86,2875	99,99013	12,20685

Concentração (µg/mL)	% de células vivas DMSO (teste 3)			Média da % de células vivas DMSO (teste 3)	Desvio
0	100	100	100	0	0
1500	98,99397	101,3944	99,59504	99,99446	1,249056
750	97,75076	101,4125	100,8343	99,99917	1,968527
187,5	98,03809	101,7744	100,1719	99,99479	1,874427
93,75	97,40305	102,2844	100,2882	99,99187	2,454114
46,87	100,8931	101,1406	97,94488	99,99288	1,777929
23,43	98,74656	102,9719	98,25669	99,99171	2,592494

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZ (teste 1)			Média da % de células vivas BZ (teste 1)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1500	68,06874	69,61436	70,03352	69,23887	1,03481
750	75,79189	77,97583	81,13618	78,3013	2,686969
187,5	98,1982	103,7915	94,47236	98,82068	4,690634
93,75	102,7027	99,05213	101,5075	101,0875	1,861187
46,87	100,4505	98,10427	100,5025	99,68574	1,369847
23,43	89,63964	96,68246	98,49246	94,93819	4,677071

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZ (teste 2)			Média da % de células vivas BZ (teste 2)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1500	DS	75,46475	76,87545	76,1701	0,997517
750	70,91521	71,15234	78,28909	73,45221	4,190536
187,5	86,02127	93,36319	96,08273	91,8224	5,204688
93,75	98,17676	104,5323	105,6864	102,7985	4,043896
46,87	91,41662	94,17858	94,34364	93,31295	1,644339
23,43	91,8993	93,61241	97,80455	94,43875	3,038111

DS: Desconsiderado.

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZ (teste 3)			Média da % de células vivas BZ (teste 3)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1500	76,49981	71,99494	72,32245	73,60573	2,511688
750	86,35283	74,27085	78,9356	79,85309	6,093021
187,5	81,13208	99,11239	91,28222	90,5089	9,01507
93,75	96,98113	96,91969	105,0218	99,64087	4,660114
46,87	95,4717	99,27799	105,0545	99,93472	4,825026
23,43	103,3962	102,5722	102,5782	102,8489	0,474026

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZFS (teste 1)			Média da % de células vivas BZFS (teste 1)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1230	67,0851	69,88556	72,37636	69,78234	2,647137
615	75,73673	75,56667	78,27086	76,52475	1,514562
153,75	50	54,44444	55,62914	53,35786	2,967709
76,87	78,06122	83,33333	89,40397	83,59951	5,676057
38,43	DS	92,77778	90,06623	91,422	1,917357
19,21	90,30612	106,1111	99,33775	98,5849	7,929338

DS: Desconsiderado.

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZFS (teste 2)			Média da % de células vivas BZFS (teste 2)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1340	60,52048	80,29491	DS	70,40769	13,98264
670	48,55007	49,69579	DS	49,12293	0,810147
167,5	37,88483	DS	33,78872	35,83678	2,896385
83,25	47,62823	50,82193	50,63156	49,69391	1,791458
41,87	65,24531	64,08526	65,45518	64,92858	0,737836
20,93	79,26156	85,26228	83,68333	82,73573	3,110566

DS: Desconsiderado

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZFS (teste 3)			Média da % de células vivas BZFS (teste 3)	Desvio
0	100	100	100	100	0
1330	77,40035	129,91	75,74333	94,35123	30,80594
665	50,71873	DS	52,35	51,53436	1,153485
166,5	41,96954	46,61231	46,54	45,04062	2,659879
83,25	50,97375	54,14711	59,55	54,89028	4,336158
41,62	74,56757	77,66116	93,25	81,82624	10,01345
20,81	85,96988	91,0562	90,55	89,19203	2,801913

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZTS (teste 1)			Média da % de células vivas BZTS (teste 1)	Desvio
0	100	100	100	100	0
690	79,90471264	90,288904	122,772623	97,65541323	22,363218
345	71,25632184	77,050685	83,08032787	77,12911155	5,9123931
172,5	44,25287356	51,369863	60,6557377	52,09282476	8,2252959
86,25	53,44827586	60,273973	81,96721311	65,22982053	14,891366
43,12	69,54022989	71,917808	81,14754098	74,2018597	6,1314832

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZTS (teste 2)			Média da % de células vivas BZTS (teste 2)	Desvio
0	100	100	100	100	0
870	60,75857143	59,242281	61,39270627	60,46451947	1,1049581
435	48,38	48,643158	47,14237624	48,05517804	0,8013853
217,5	26,52428571	31,336316	24,24234323	27,36764825	3,6214026
108,75	31,69285714	DS	32,4130363	32,05294672	0,5092436
54,37	68,76571429	41,98	57,75557756	56,16709728	13,463323
27,18	70,70714286	64,560526	81,86815182	72,378607	8,7740424
21,56	77,5862069	73,972603	92,62295082	81,39392015	9,8910506

DS: Desconsiderado.

Concentração (µg/mL)	% de células vivas BZTS (teste 3)			Média da % de células vivas BZTS (teste 3)	Desvio
0	100	100	100	100	0
940	60,4885124	56,630648	55,00363296	57,37426438	2,8170374
470	53,36239669	52,380364	50,31816479	52,02030862	1,5537268
235	34,62884298	32,820364	30,38363296	32,61094677	2,1303389
117,5	36,79173554	34,140081	32,76629213	34,56603621	2,0462471
58,75	70,2231405	DS	41,45692884	55,84003467	20,340783
29,37	97,25454545	101,8	83,07340824	94,04265123	9,7677279

APÊNDICE B - Média das concentrações e das porcentagens de células viáveis

Média das concentrações BZ (µg/mL)	Média da % de células vivas	Desvio
0	100	0
1500	73,0049	3,50446
750	77,2022	3,338986
187,5	93,71732	4,468164
93,75	101,1756	1,580641
46,87	97,64447	3,753275
23,43	97,40861	4,718028

Média das concentrações BZFS (µg/mL)	Média da % de células vivas	Desvio
0	100	0
1300	78,18042	14,00782
650	59,06068	15,17231
162,5833	44,74508	8,76428
81,12333	62,7279	18,26112
40,64	79,39228	13,41337
20,31667	90,17092	7,969849

Média das concentrações BZTS (µg/mL)	Média da % de células vivas	Desvio
0	100	0
833,3333	71,8314	22,41756
416,6667	59,0682	15,76636
208,3333	37,35714	13,02798
104,1667	43,9496	18,472
52,08	62,06966	10,50806
26,03667	82,60506	10,88269