

**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

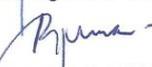
TÍTULO DA TESE: Atividade de derivados benzofuroxânicos na expressão da enzima triparedoxina peroxidase mitocondrial de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

AUTORA: ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

ORIENTADORA: REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI

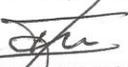
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:


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.

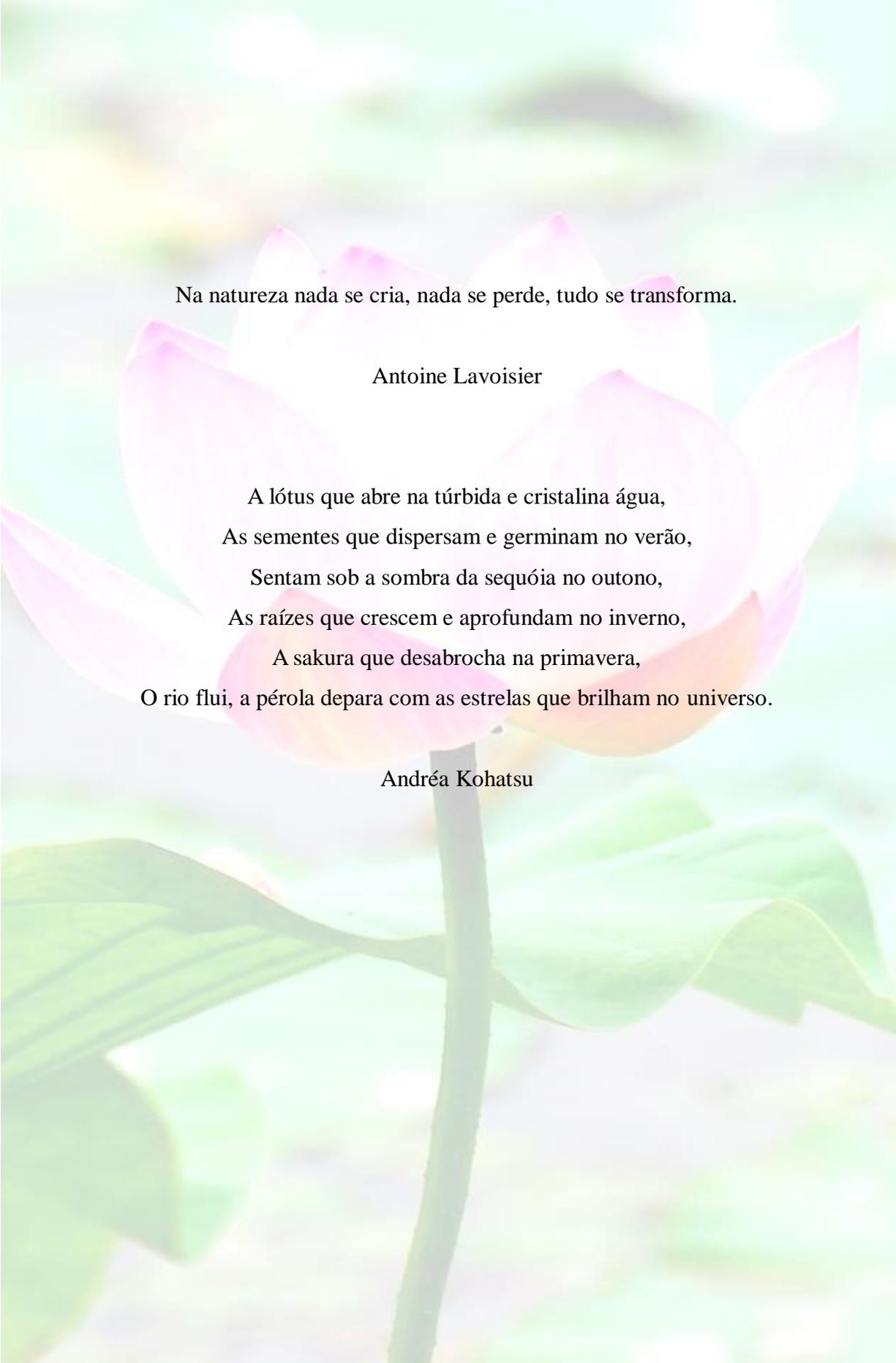
À professora Dra. Man Chin Chung e à professora Dra. Vera Lucia Borges Isaac, por terem cedido as substâncias e as células de hepatoma humano, respectivamente, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

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 têm 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 bioredutor 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 $Ca^{+2}/Mg^{+2}/pH$ 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 | |

protéicos105

Figura 52 SDS-PAGE 10%, corado com 12 mM AgNO₃, da purificação do extrato total (2,5 μg) por cromatografia de afinidade com CNBrTM (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”, vivem nas frestas e telhas das habitações (Figura 2) de palha e barro (LEWINSON, 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.

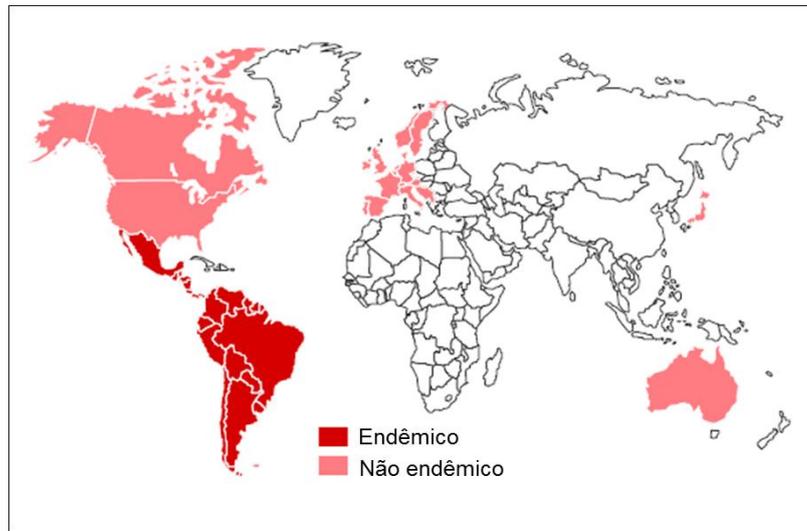
Figura 2: Moradia tipo pau a pique na região estudada por Carlos Chagas.



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).

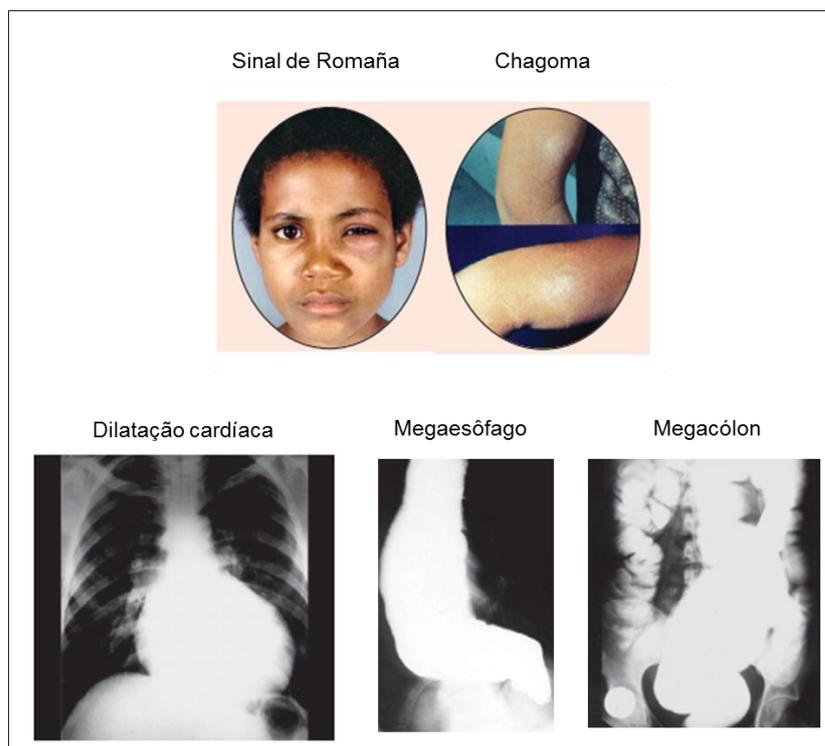
Apesar da patogênese da fase crônica não ser completamente entendida, acredita-se que a persistência do parasito é necessária para o desenvolvimento da doença. Porém não se sabe se os danos aos tecidos são ocasionados diretamente pelo parasito ou indiretamente pela interação do parasito com o sistema 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

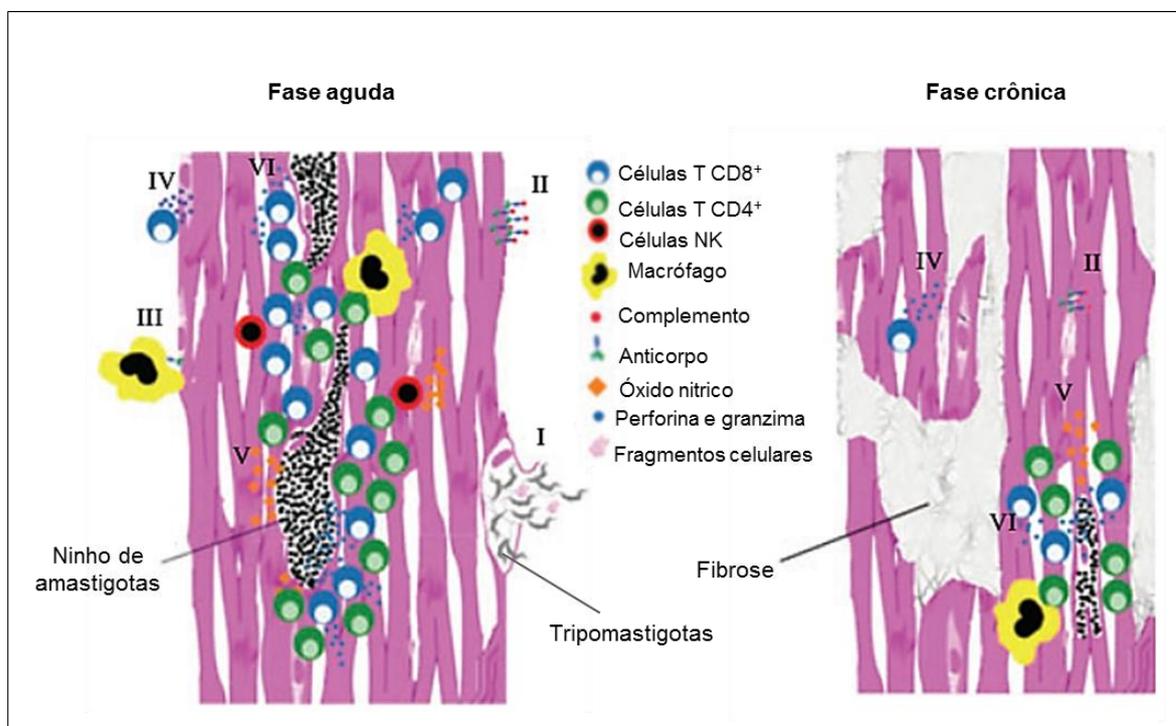
de predominância anti inflamatória está associado com a forma indeterminada. Na forma indeterminada assintomática existe uma relação de maior produção de citocina anti inflamatória, interleucina IL-10, em relação às citocinas inflamatórias, como interferon gama - IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa - 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: Imunopatogênese 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.



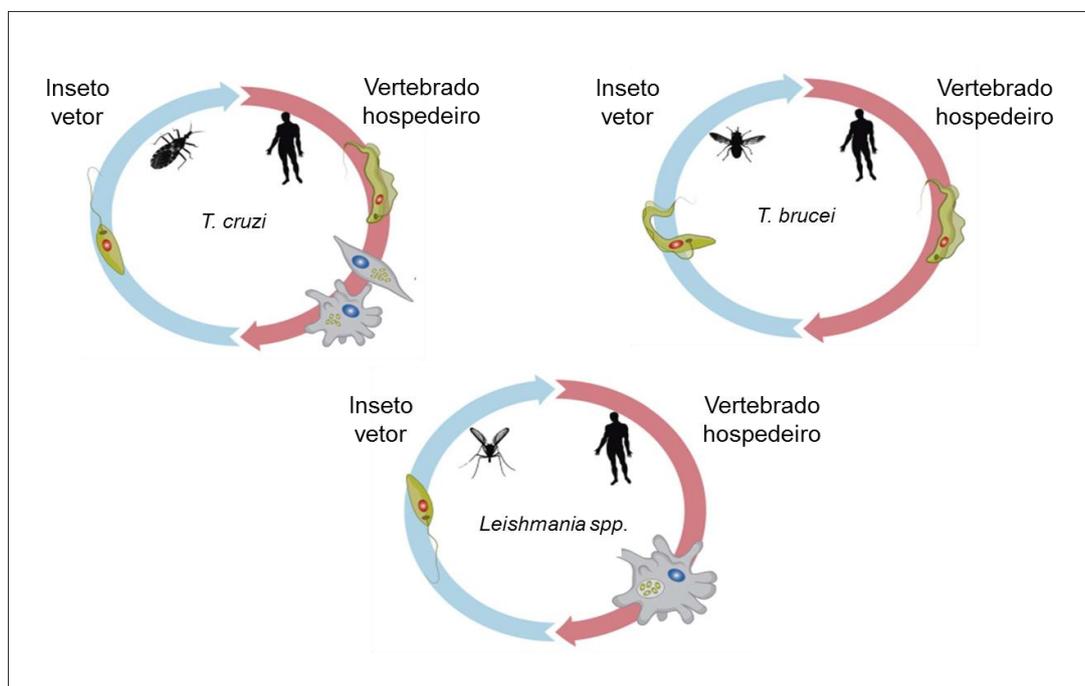
Fonte: Modificado de Gutierrez et al., 2009.

1.3. Morfologia e ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas (tripanosossomíase 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 tripanosossomíase africana - *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, 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*.



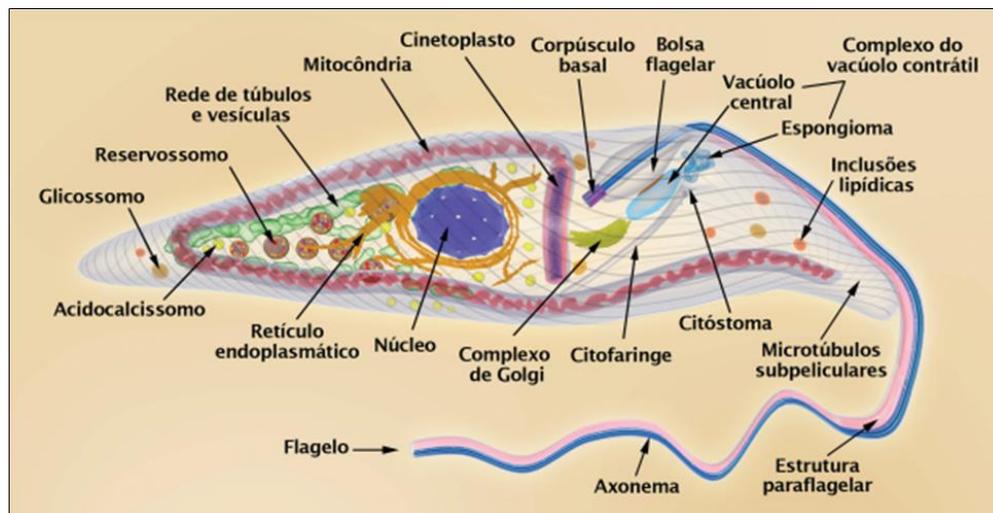
Fonte: Modificado de Bartholomeu et al., 2014.

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).

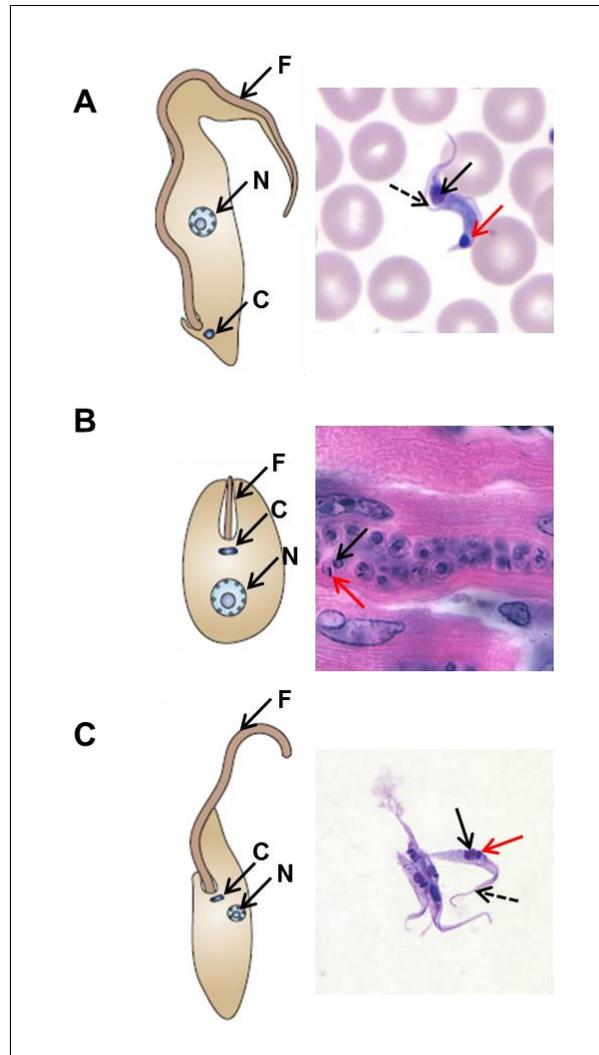
Figura 7: Esquema do corpo celular da forma epimastigota de *T. cruzi*.



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).

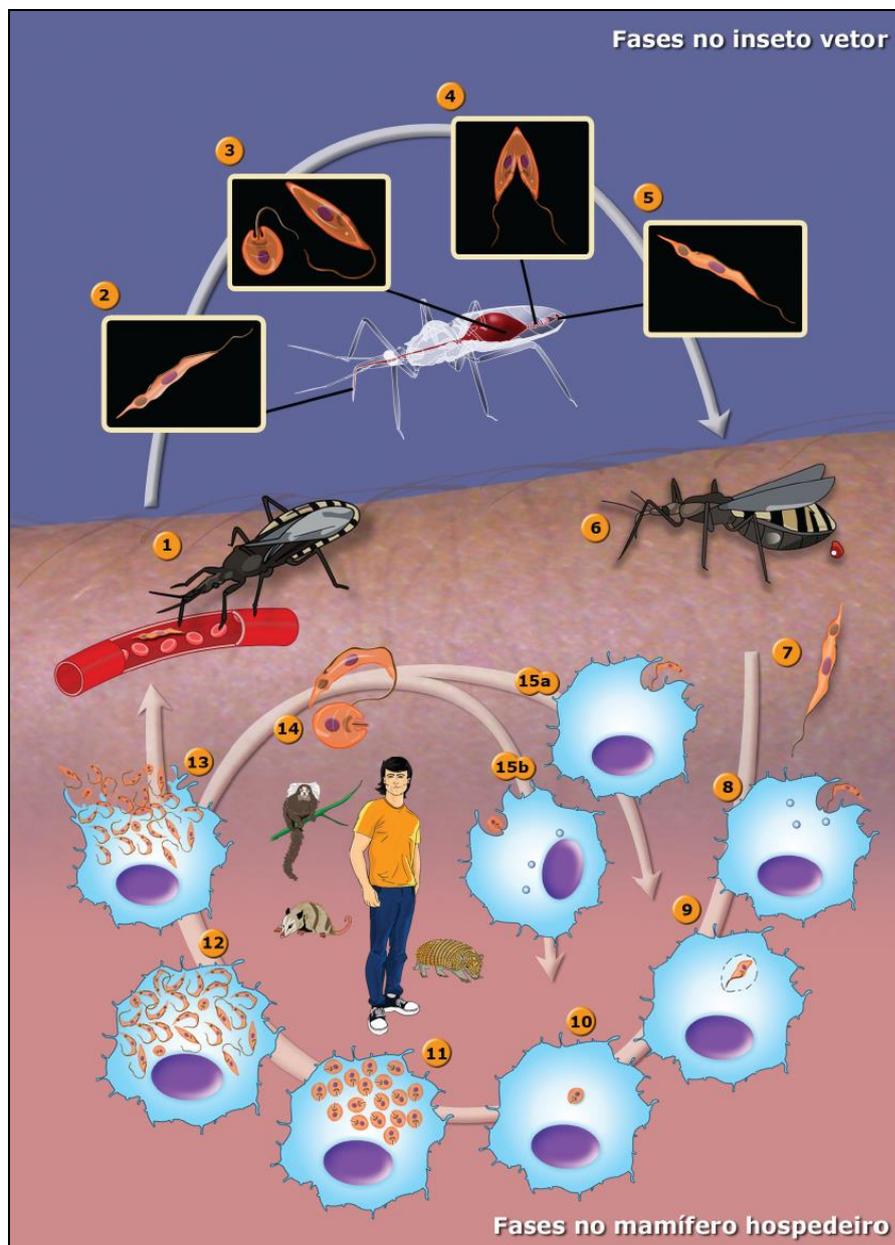
Figura 8: Morfologia de *T. cruzi*. (A) Tripomastigota no sangue. (B) Amastigota em tecido cardíaco. (C) Epimastigota em meio de cultura. As setas indicam, (vermelho - C) cinetoplasto, (preto - N) núcleo e (preto tracejado - F) flagelo.



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.

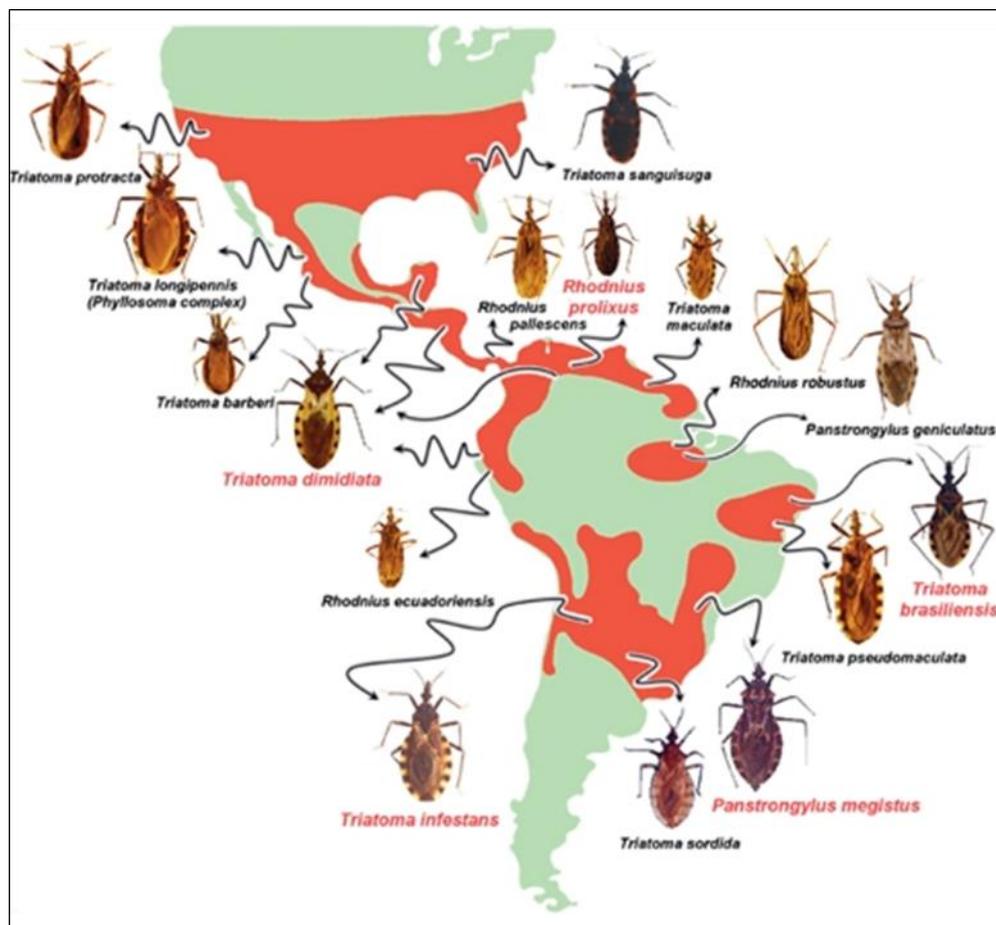
O ciclo de vida do parasito (Figura 9) é complexo e passa por distintos locais nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (TEIXEIRA et al., 2011). Alterna entre vertebrados das Ordens Marsupialia, Edentata, Chiroptera, Rodentia, Artiodactila, Carnivora e Primates (HOARE, 1972; JANSEN; ROQUE, 2010) e 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.

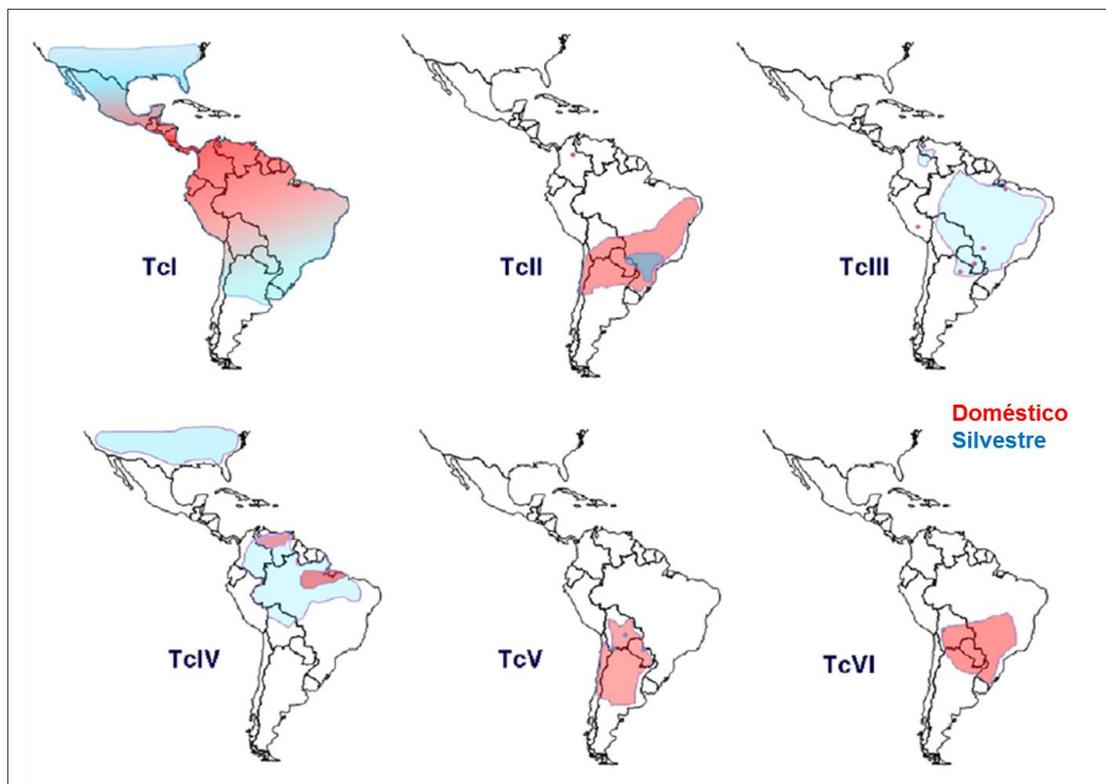
1.4. Diversidade populacional de *T. cruzi*

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.

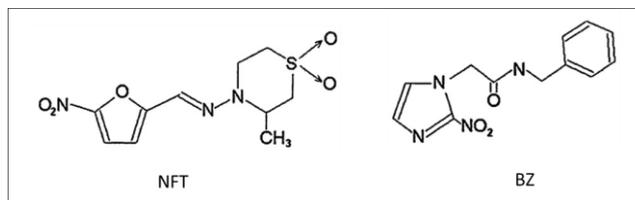


Fonte: Modificado de Zingales et al., 2012.

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

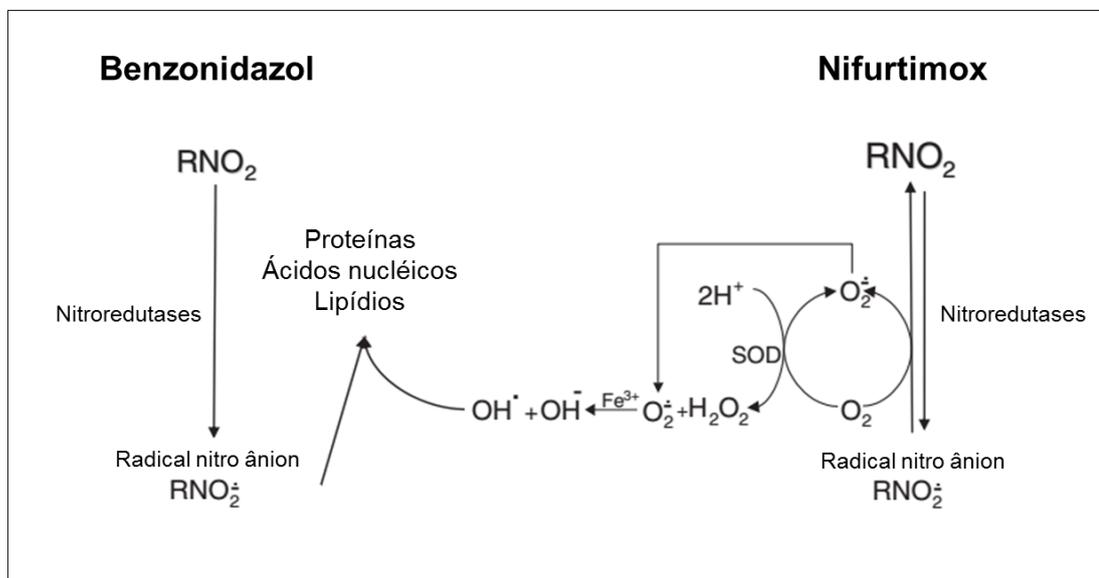
al., 2001). Acrescente-se a essas limitações, a falta de biomarcadores robustos na avaliação da cura (PINAZO et al., 2014; SANTAMARIA et al., 2014; PINAZO et al., 2015).

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).

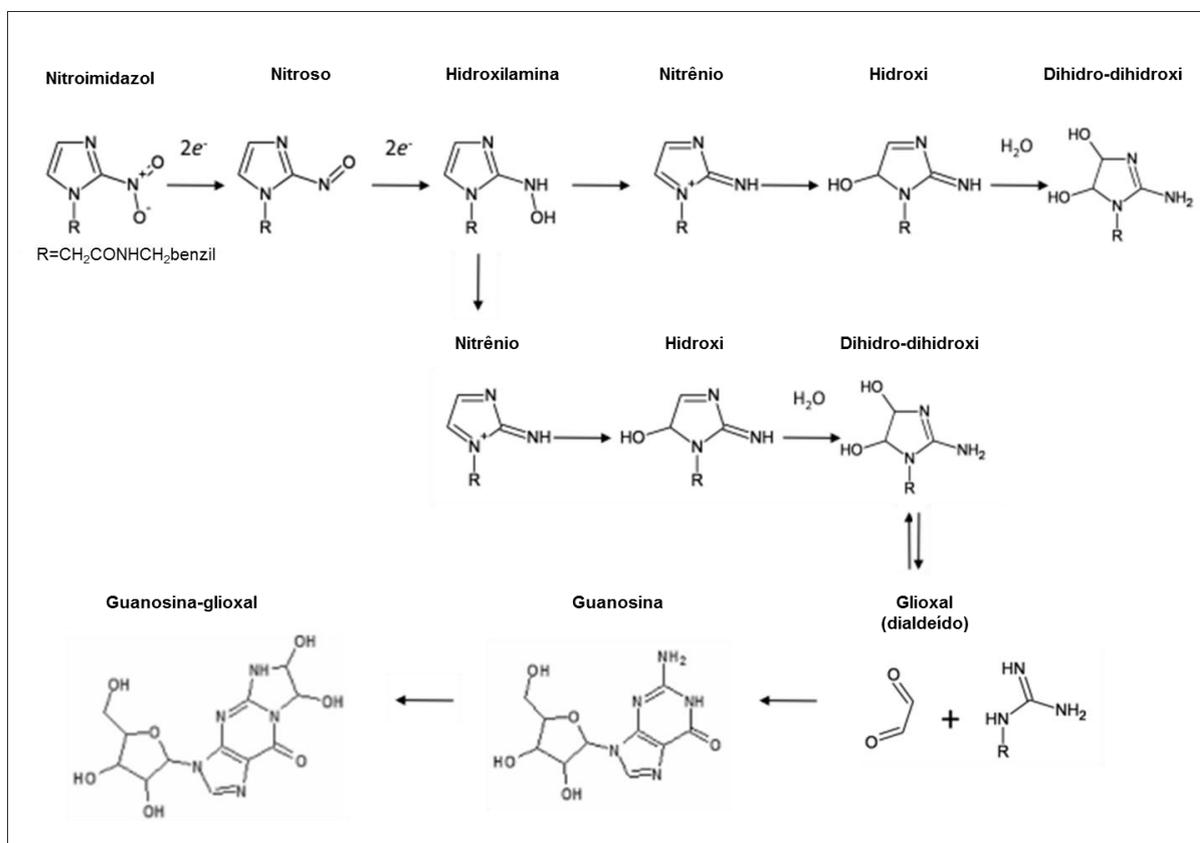
Figura 13: Ação de benzonidazol e nifurtimox. O grupo nitro de benzonidazol e nifurtimox é reduzido, a radicais livres e metabólitos eletrofílicos e radicais intermediários de nitro ânion ($R\text{-NO}_2\bullet^-$), por nitroreduzases dependentes de citocromo P-450. $R\text{-NO}_2\bullet^-$ ao reagir 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 nitroreduzase 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 nitroreduzase tipo I, presente em procariotos e alguns protozoários parasitos, como *T. cruzi*, porém ausente em humanos. Essa nitroreduzase 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 hidroxilado. O derivado hidroxilado ao receber água forma isômeros *cis* e *trans* de dihidro-dihidroxilado que ao quebrar libera glicoxal. A redução de benzonidazol produz glicoxal, metabólito citotóxico, um di-aldeído capaz de formar aductos com proteínas, DNA e pequenas moléculas, como glutatona. Os efeitos deletérios de glicoxal 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

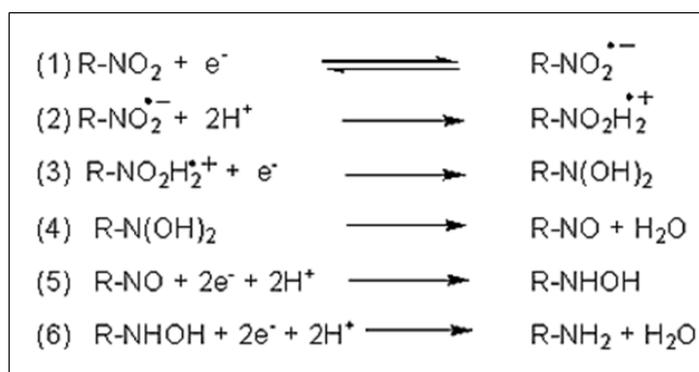
polaridade, e as propriedades eletrônicas e estéricas. A bio-redução enzimática resulta em radicais livres que são tóxicos para bactérias e parasitos. Nitro compostos tem sido utilizados na terapêutica como anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, sedativos/hipnóticos, anticoagulantes, anti-histamínicos 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 bioreductor de nitro compostos.

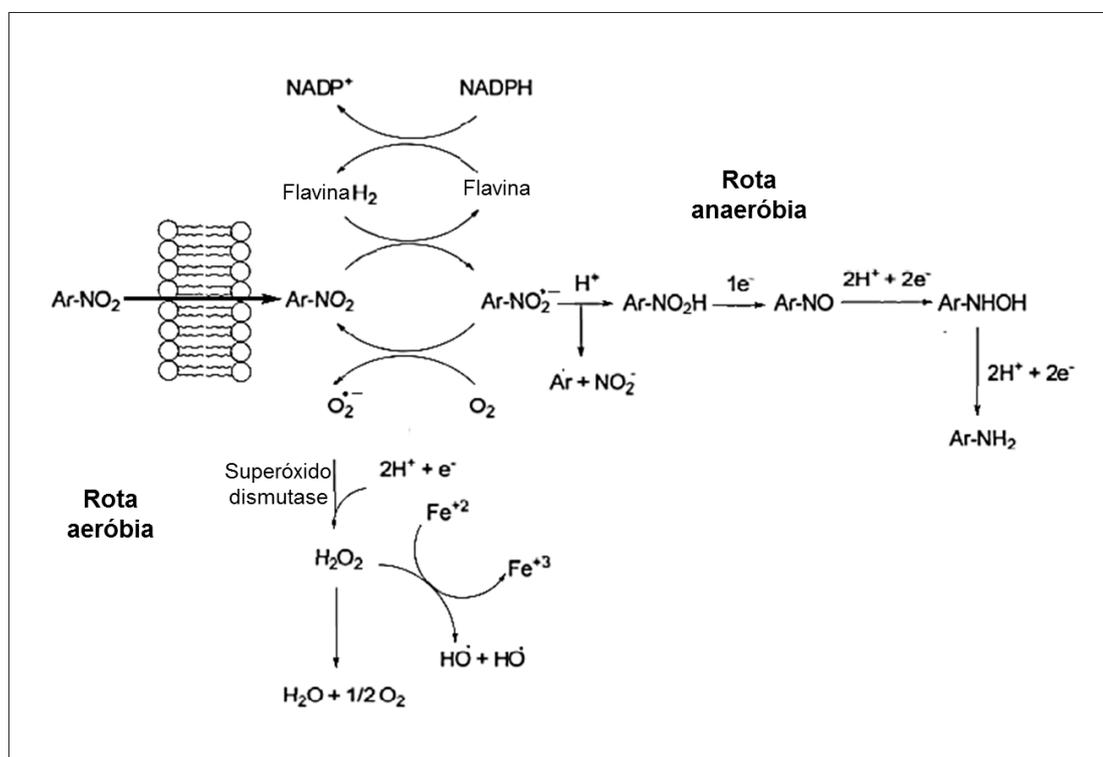


Fonte: Chung et al., 2011.

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.

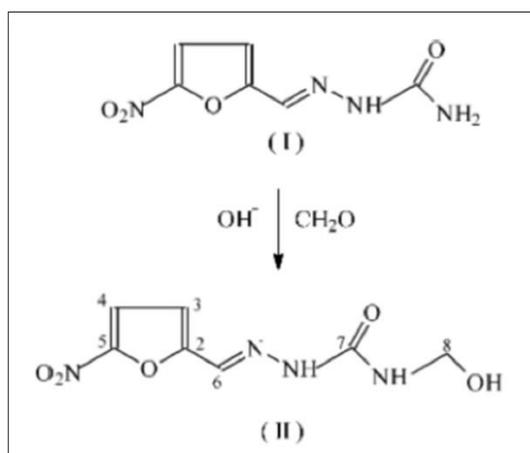


Fonte: Chung et al., 2011.

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), conseqüentemente altera o *trans-splicing*, reação de esterificação para formação de RNAm de tripanosomas (BARBOSA et al., 2007).

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



Fonte: Chung et al., 2003.

1.6.2. Derivados benzofuroxânicos

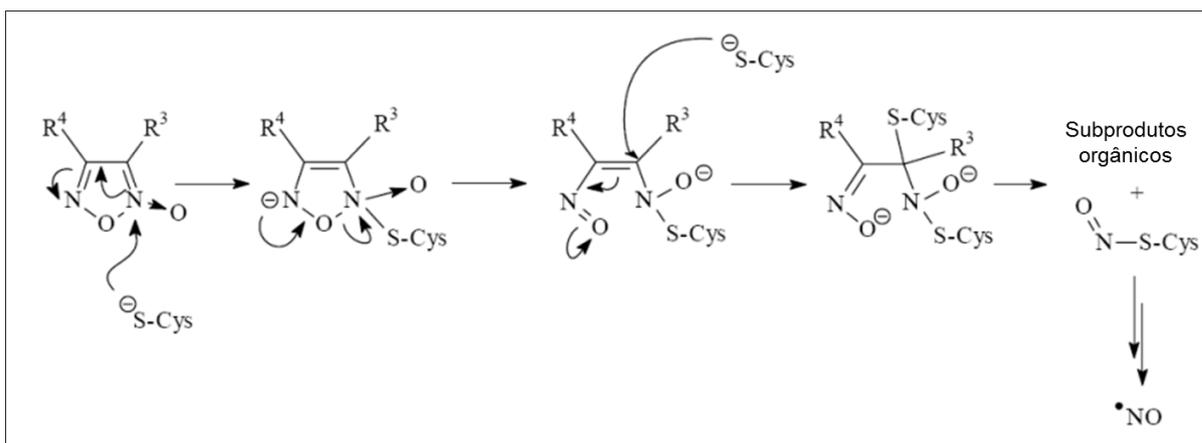
Compostos benzofuroxânicos apresentam atividade anti tumor (FARIAS et al., 2015). bacteriostática e fungistática (CHUGUNOVA et al., 2014) e anti leishmania (DUTRA et al., 2014). Derivados benzofuroxânicos apresentaram também atividade anti *T. cruzi*, para formas epimastigotas (BOIANI et al., 2010; JORGE 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 =N (→O) O⁻ presente nos derivados benzofuroxânicos confere as propriedades eletro-ceptoras 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, -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).

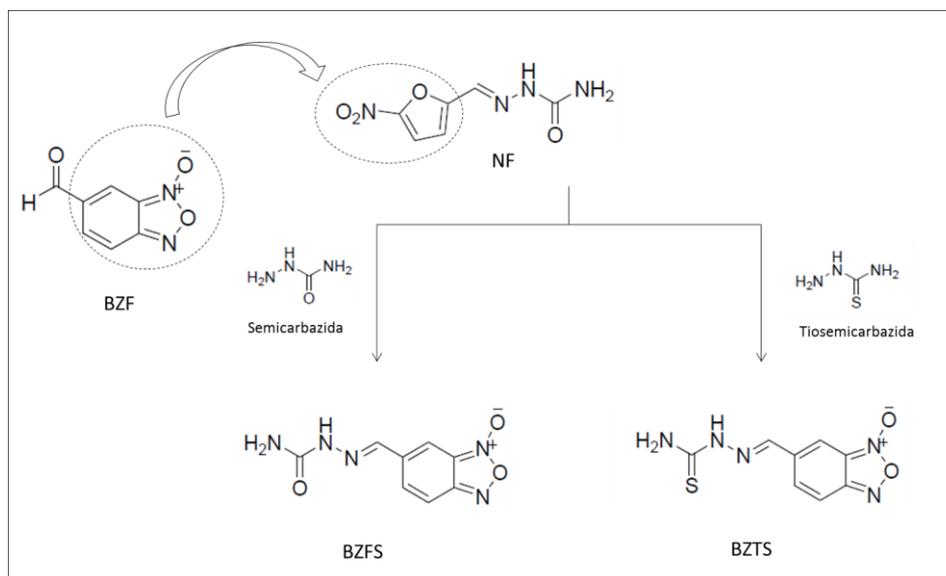
Figura 18: Mecanismo proposto para liberação de NO dependente de tiol por núcleo furoxânico.



Fonte: Bosquesi, 2013.

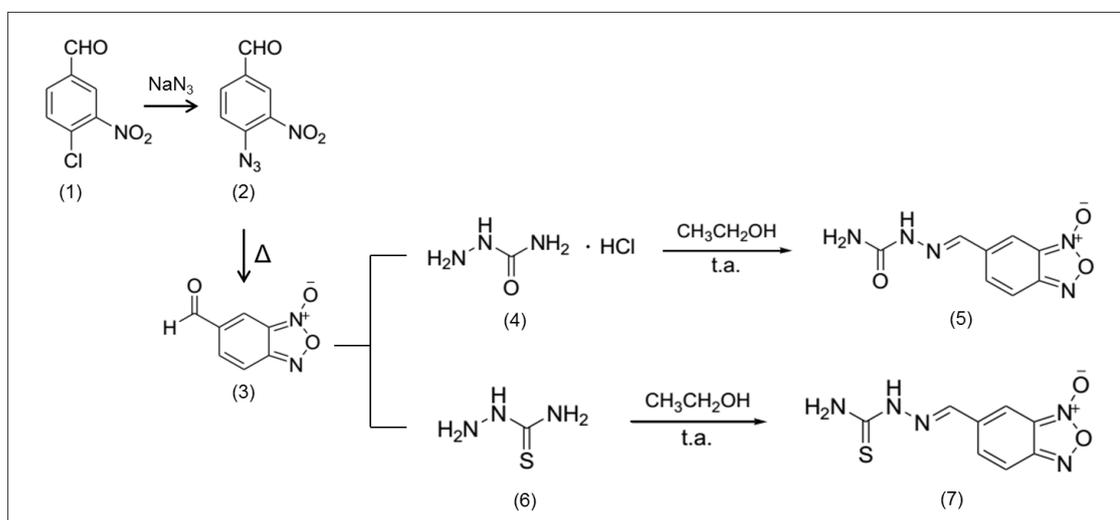
Nifurtimox, derivado nitrofurânico, bem como hidroximetilnitrofural (CHUNG et al., 2003; BARBOSA et al., 2007) e derivados benzofuroxânicos (BOIANI et al., 2010) apresentam atividade anti *T. cruzi*; os benzofuroxânicos podem inibir tripanotiona redutase (JORGE et al., 2013). Bosquesi (2013) sintetizou 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-carbamoilidrazona)-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.

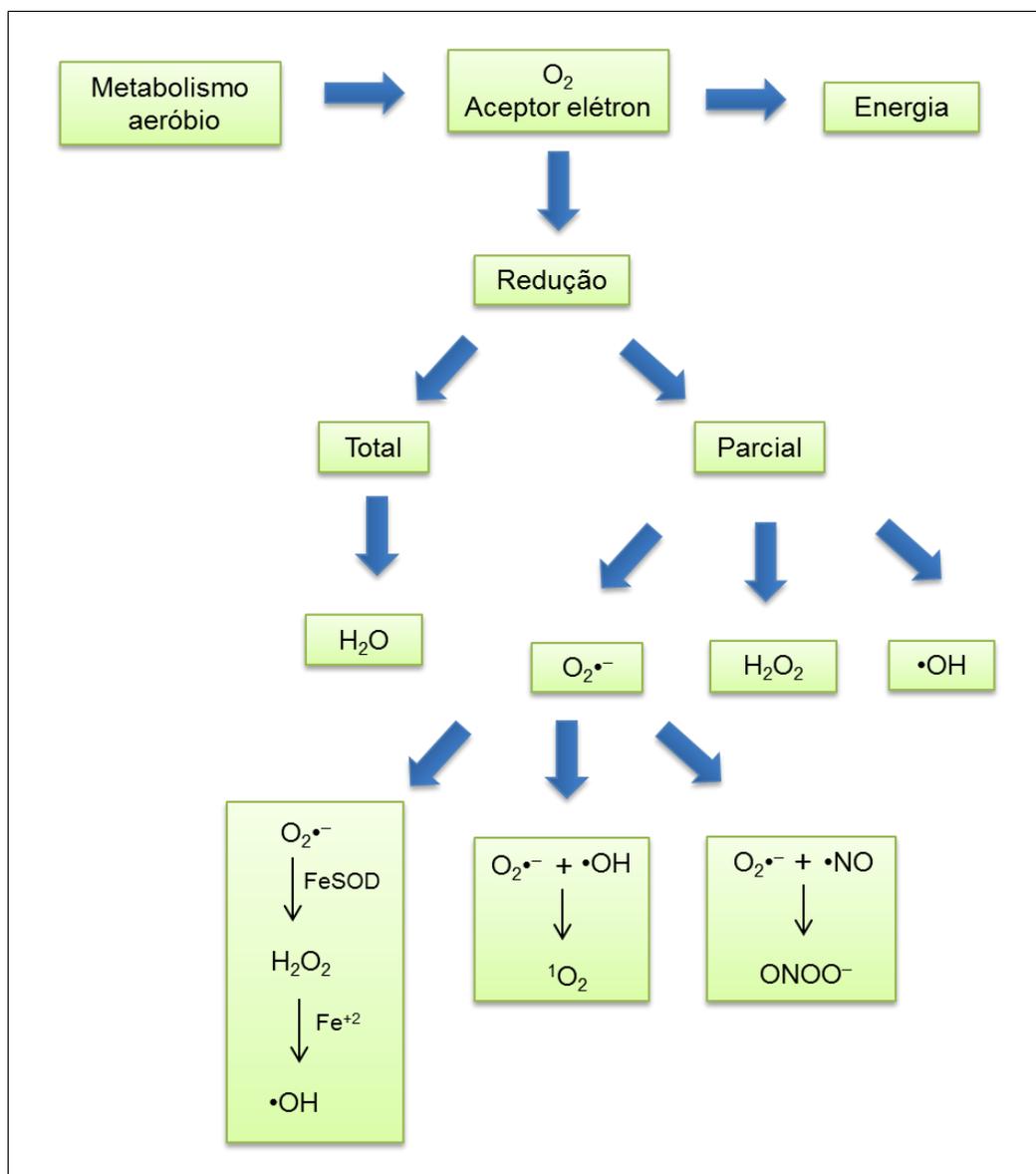


Fonte: Modificado de Bosquesi, 2013.

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).

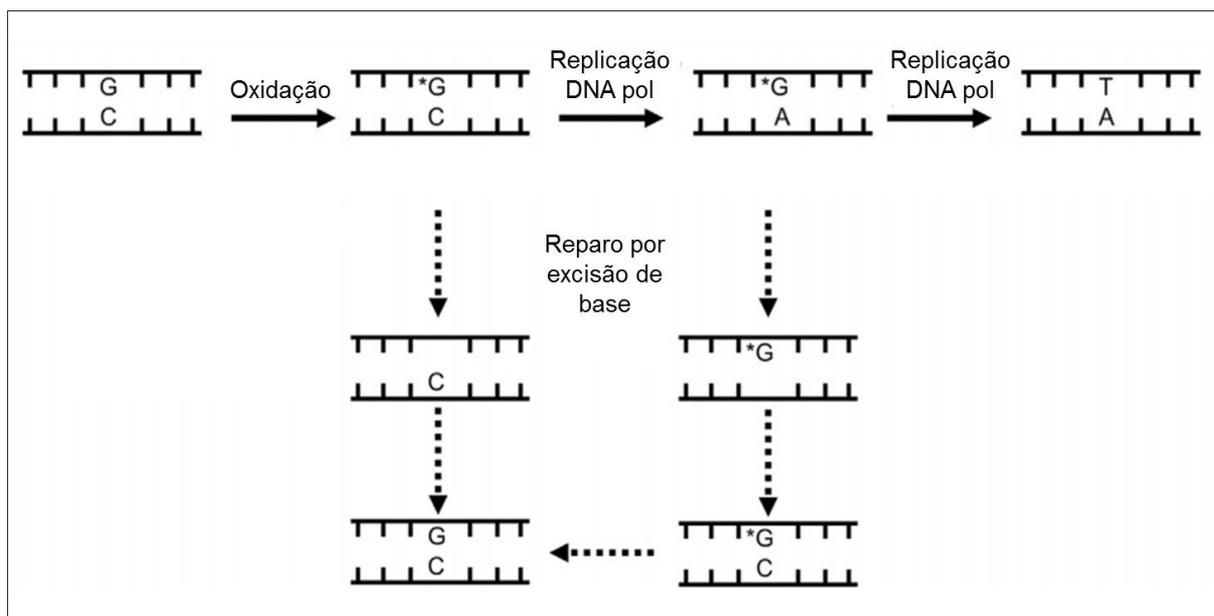
O radical $\bullet\text{OH}$ é o mais deletério, pois apresenta meia-vida muito curta e alta reatividade, ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Pode ser formado pela reação de H_2O_2 com metais de transição. O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, proteínas 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 quebradas 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 quebradas são letais se deixadas não pareadas, pois as bases oxidadas podem ser mutagênicas, citotóxicas ou ambas. Duplas quebradas 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 transversão C:G para A:T. O reparo no DNA pode ser por excisão de base para remover 8-oxoG.



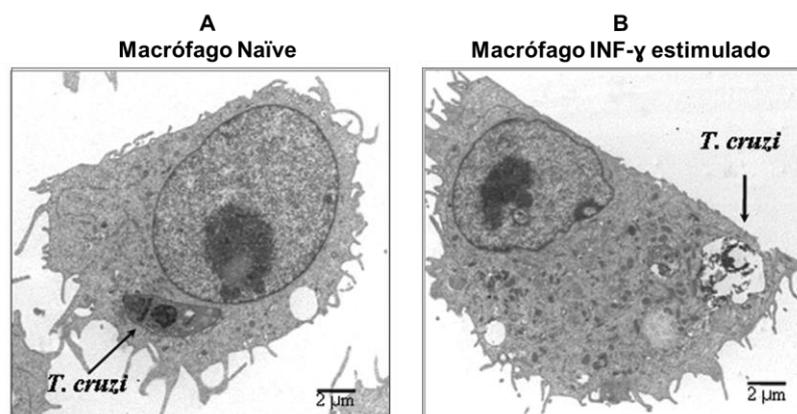
Fonte: Modificado de Machado-Silva et al., 2016.

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 nitração 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).

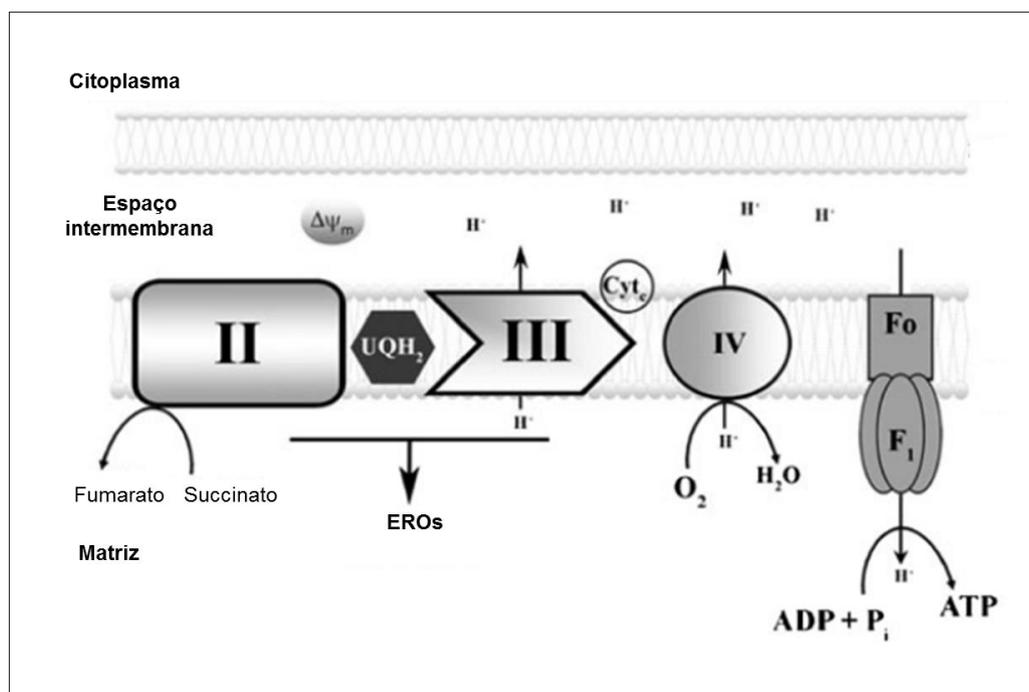
1.8.1. Cadeia respiratória

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.



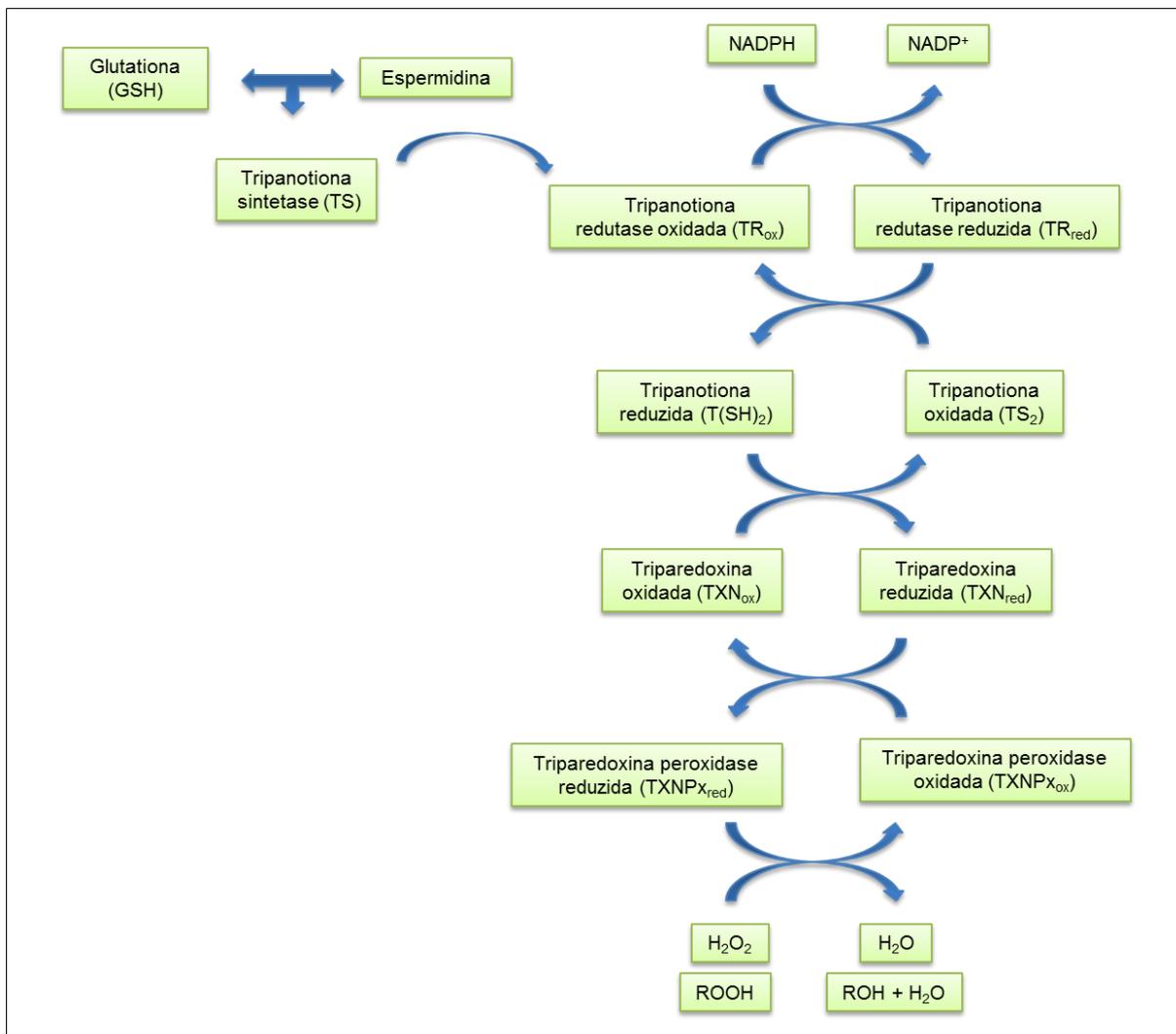
Fonte: Modificado de Gonçalves et al., 2011.

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 (TS₂) 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).

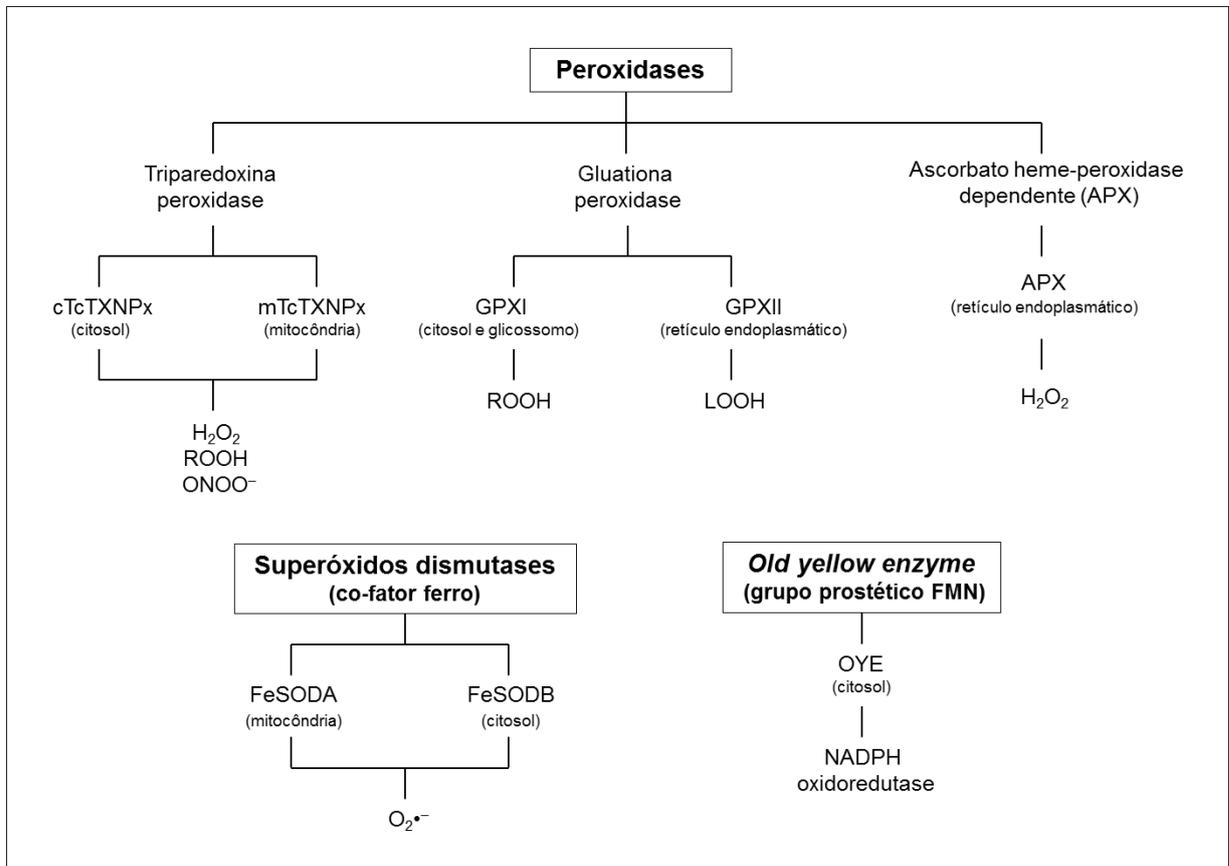
Com isso é formado o sistema constituído por tiol peroxidases (Figura 25) que contém oxidoreduases da superfamília tioredoxina: triparedoxina peroxidase (TXNPx), reduzida por triparedoxina (TXN), que por sua vez é mantida no estado reduzido por tripanotiona (T(SH)₂), mantida no estado reduzido por tripanotiona 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⁻, H₂O₂ e pequenas cadeias orgânicas de hidroperóxidos. Ascorbato heme-peroxidase dependente (APX), no retículo endoplasmático, converte o H₂O₂ em H₂O (PIACENZA et al., 2012)

Figura 25: Sistema de tiol peroxidases em *T. cruzi*.

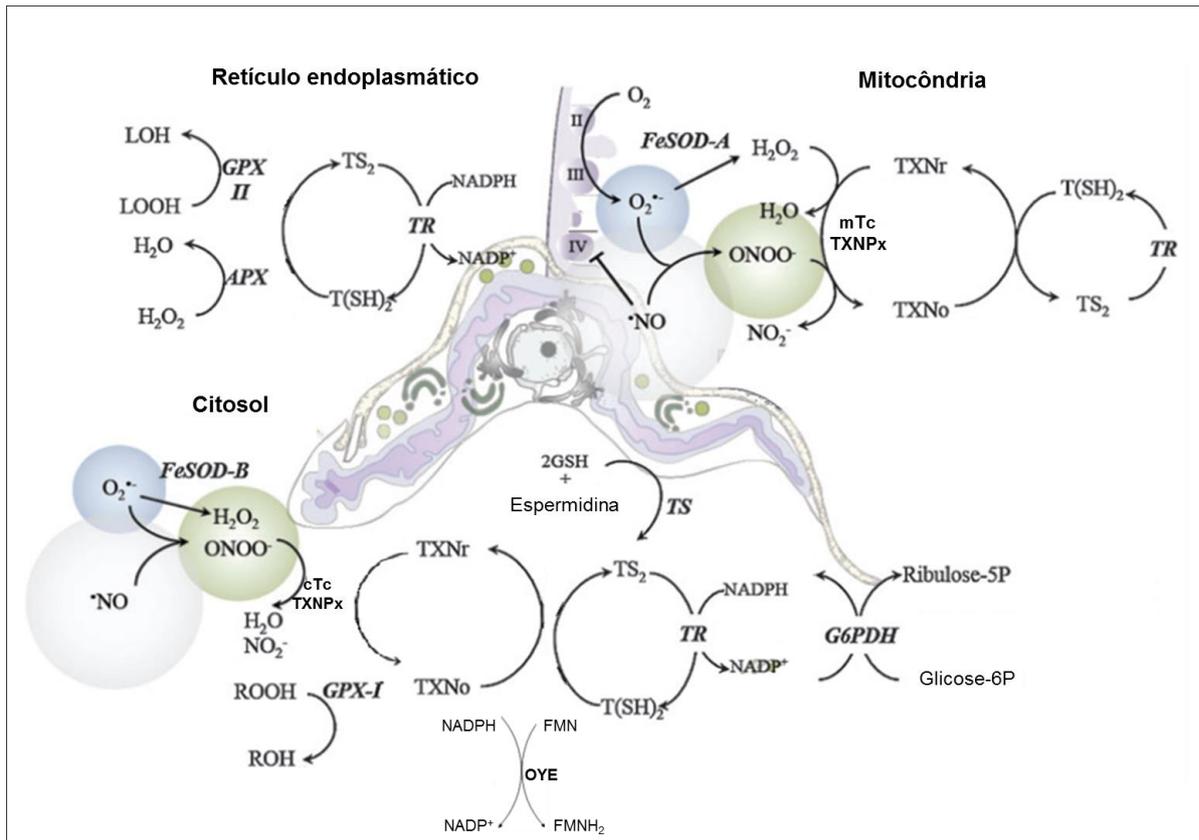
Fonte: Autor.

Em *T. cruzi* (Figuras 26 e 27) foram descritas cinco peroxidases (duas glutations peroxidases, duas triparedoxinas peroxidases e uma ascorbato heme-peroxidase dependente) que diferem na localização subcelular e substrato específico. Glutaciona peroxidase-I (GPXI), localizada no citosol e glicossomo, atua em hidroperóxidos (ROOH), enquanto que glutaciona 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⁻, H₂O₂ e pequenas cadeias orgânicas de hidroperóxidos. Ascorbato heme-peroxidase dependente (APX), no retículo endoplasmático, converte o H₂O₂ em H₂O (PIACENZA et al., 2012).

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

Fonte: Autor.

Figura 27: Distribuição subcelular em *T. cruzi* (citossol, 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.

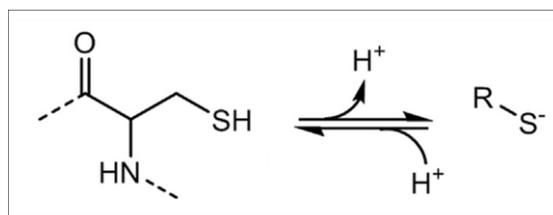
Além das peroxidases, existem quatro superóxidos dismutases que contém ferro como co-fator metálico (FeSOD). Realizam a dismutação do ânion $O_2^{\bullet-}$ para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Localizam-se na mitocôndria (FeSODA), no citossol (FeSODB) e glicossomo (MATEO et al., 2008). No citossol 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.

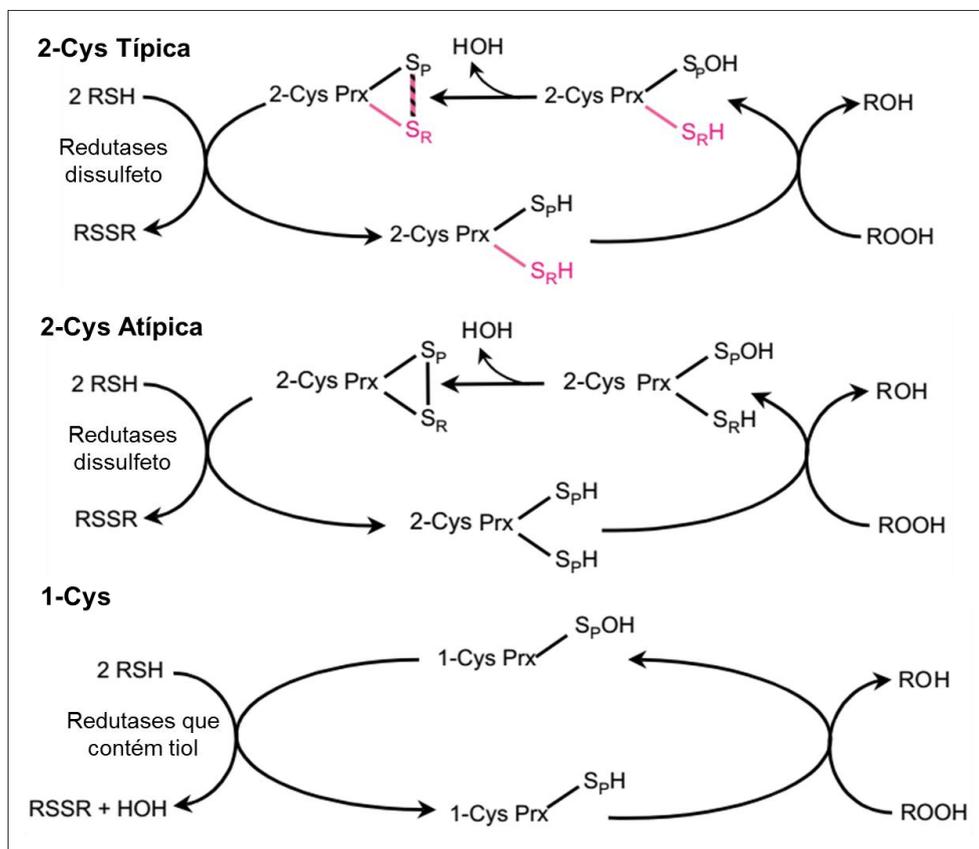


Fonte: Modificado de Poole, 2015.

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).

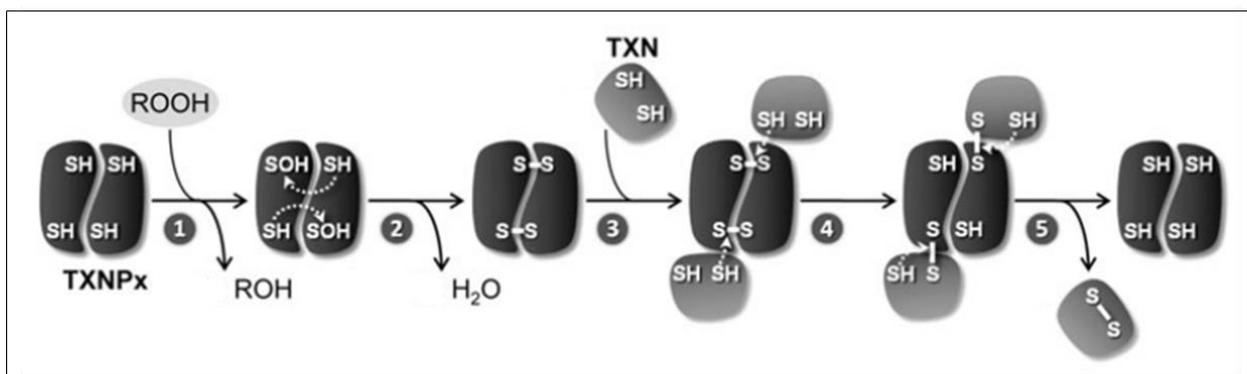
Figura 29: Mecanismo da reação catalítica de TXNPx (Prx). Para as três classes de Cys, no primeiro passo da reação, a cisteína peroxidática (S_pH) é oxidada a ácido sulfênico (S_pOH) ao atacar o substrato peróxido ($ROOH$). No segundo passo da reação, no caso da 2-Cys típica, a cisteína resolução (S_RH), 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 ditiol (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 peroxidase, 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).

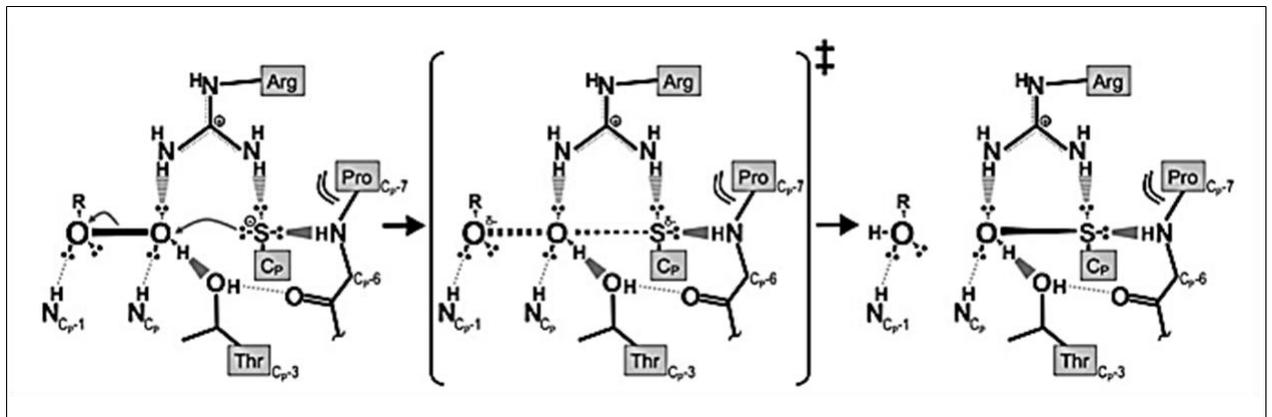
Figura 30: Mecanismo catalítico de TXNPx (2-Cys típica). 1: Cisteína peroxidática (C_p) do dímero de triparedoxina peroxidase (TXNPx) reage com ROOH e produz ROH (álcool) e $-SOH$ (ácido sulfênico). 2: Ocorre a formação da ligação ponte dissulfeto ($S-S$) intermolecular entre TXNPx, reações entre Cys 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 resolvida 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).

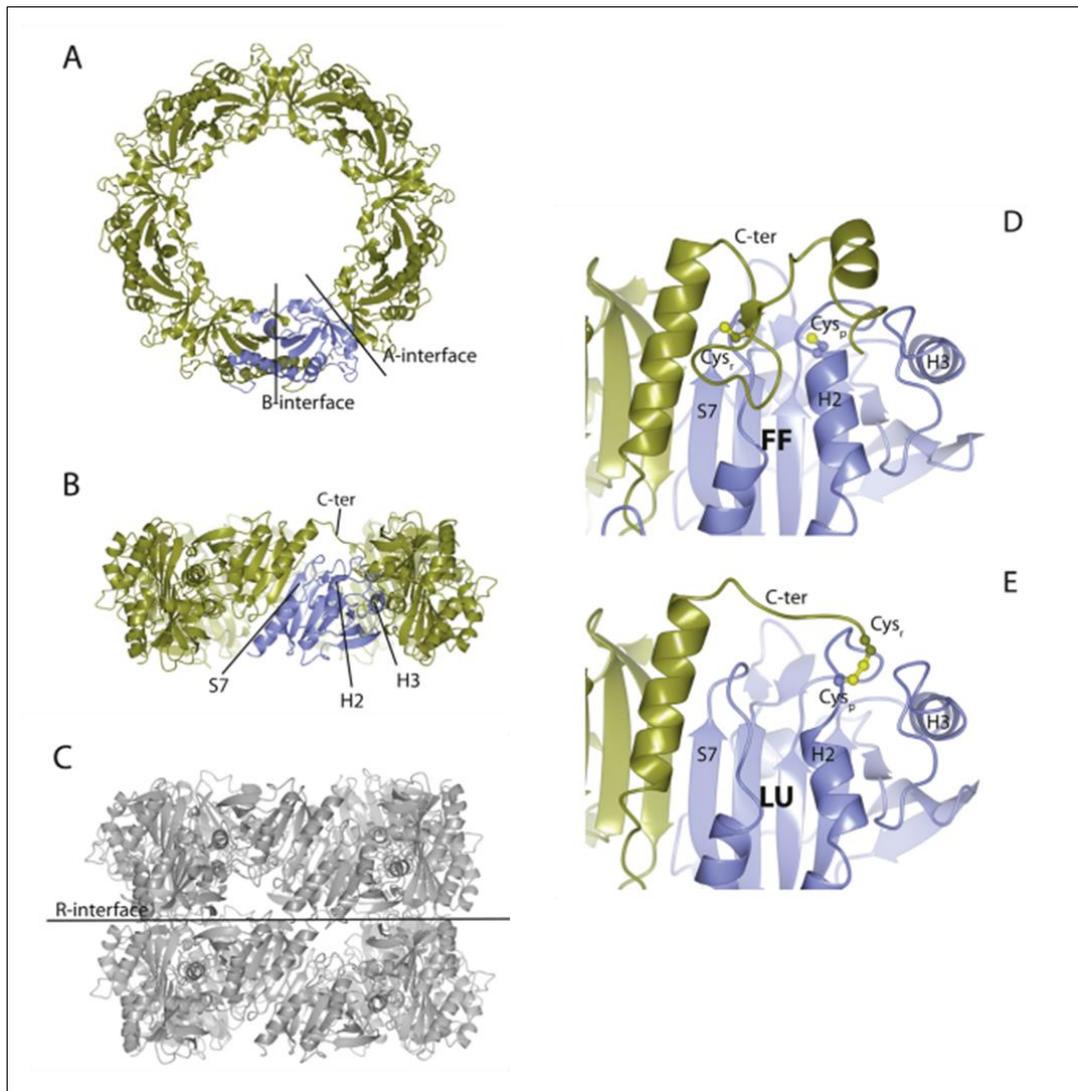
Figura 31: Reação de peroxidação realizada por TXNPx. Ataque nucleofílico do átomo de enxofre da cisteína ao átomo de oxigênio do peróxido. A reação libera álcool e produz cisteína oxidada de TXNPx a ácido sulfênico.



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- $\beta 7$ (S7) e hélices- $\alpha 2$ (H2) e $\alpha 3$ (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- $\alpha 3$ (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- $\alpha 2$ 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.

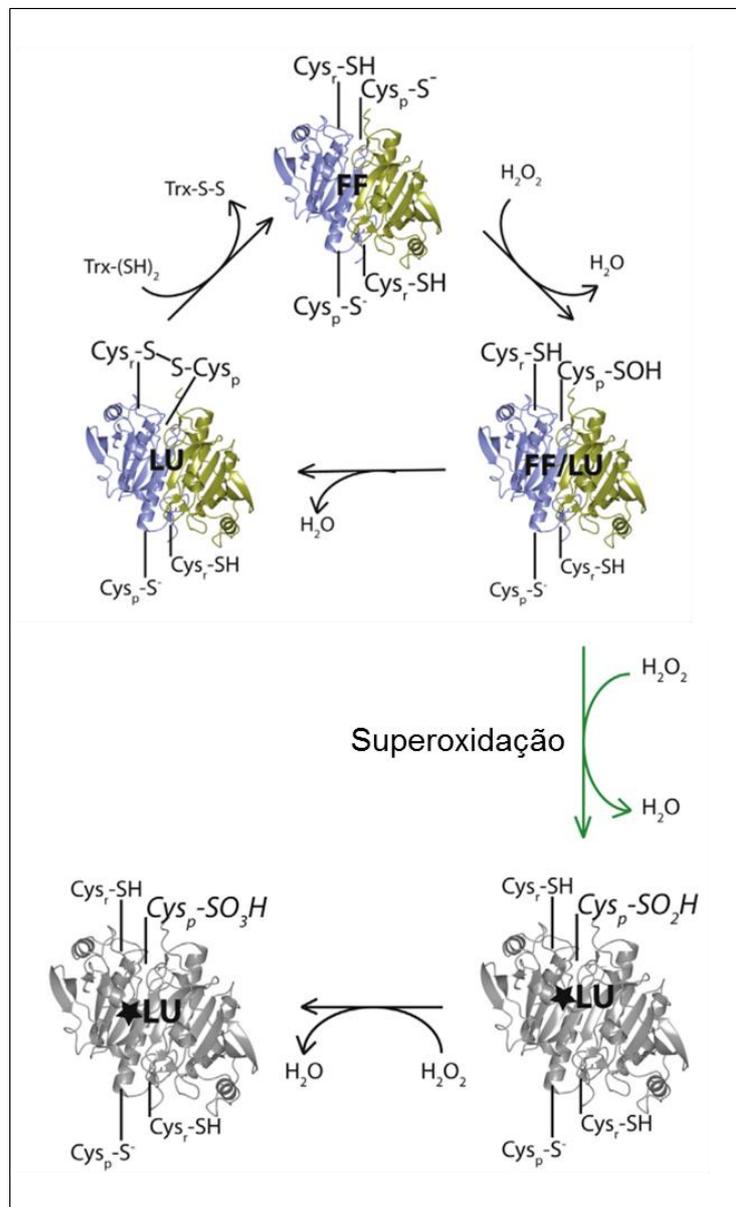


Fonte: Modificado de Angelucci et al., 2016.

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 sulfínico, 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).

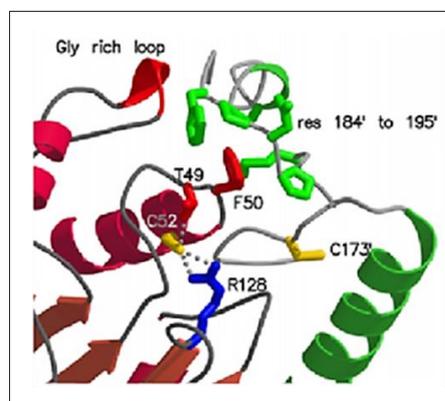
Figura 33: Esquema da reação de um homodímero de 2-Cys típica TXNPx. As duas subunidades estão representadas por azul e dourado. O rearranjo da estrutura terciária no sítio ativo (representado apenas um), de uma estrutura totalmente dobrada (FF) para uma desdobrada localmente (LU), permite a formação 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).

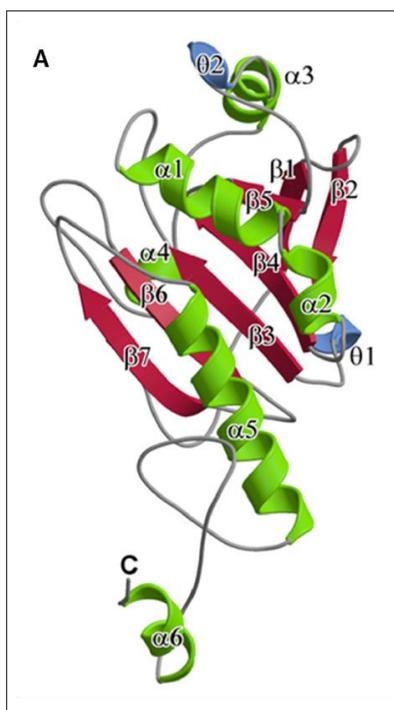
Figura 34: Sítio ativo de TXNPx. Resíduos Thr49 (vermelho) e Arg128 (azul) interagem por ligação hidrogênio com Cys52 (cisteína peroxidática, amarelo), na outra subunidade do homodímero está Cys173 (cisteína resolução, amarelo). Os resíduos Met184, Pro186, Asp187, Pro188, Ser191 e Phe195(verdes) presentes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

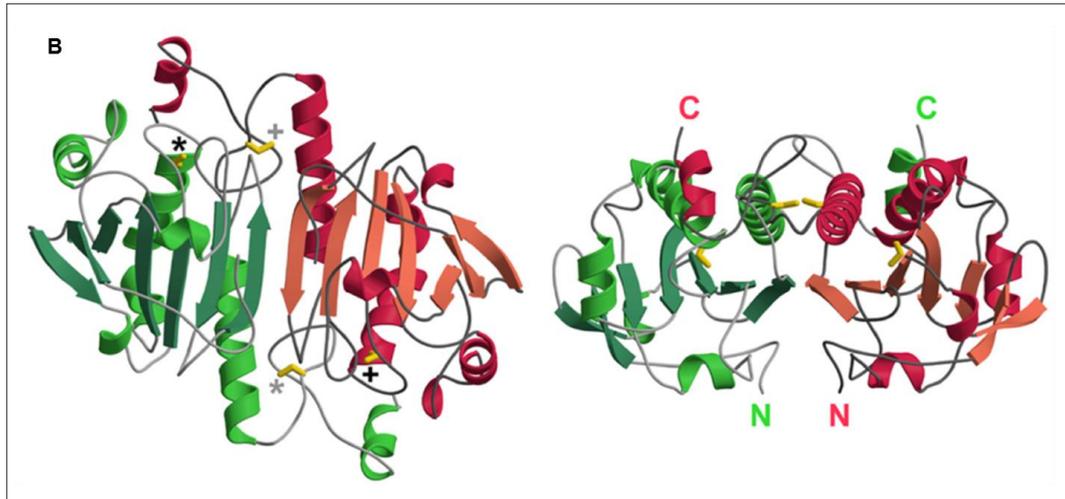


Fonte: Modificado Piñeyro et al., 2005.

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).

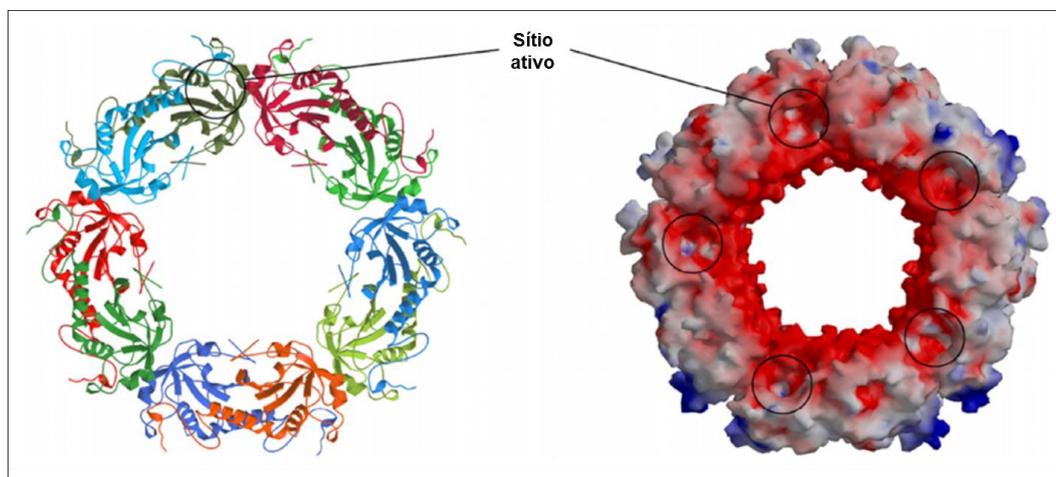
Figura 35: Estruturas de peroxiredoxina de *T. cruzi*. (Painel A): Estrutura do monômero - a estrutura secundária está representada pelas cores, vermelho: dobras- β ; verde: hélices- α ; azul: hélices- 3_{10} . (Painel B): Estrutura do dímero. À esquerda, vista paralela; à direita, vista perpendicular. 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 peroxidase de *T. cruzi*. À esquerda, representação em fita do homodécimo, 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.

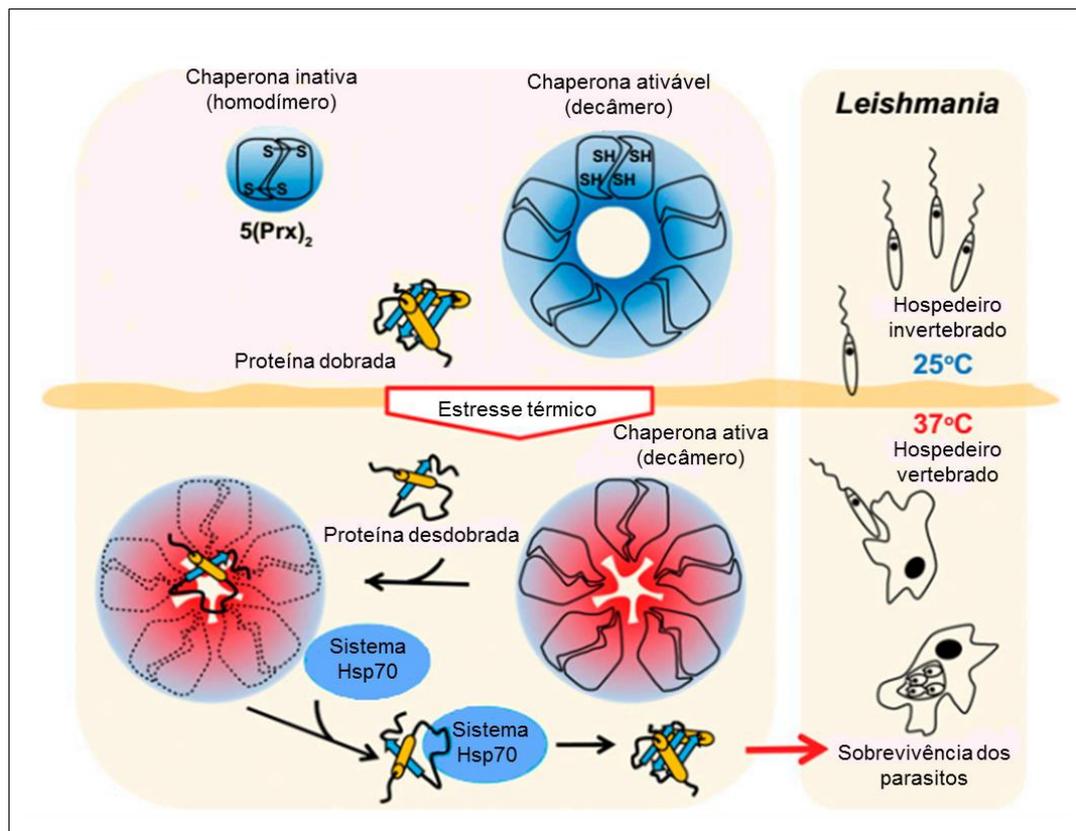
Em *T. cruzi*, TXNPx ocorre tanto na mitocôndria (mTcTXNPx) como no citosol (cTcTXNPx) (WILKINSON et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2009; PIÑEYRO et al., 2011). TXNPx apresenta um papel principal na minimização da formação de radicais derivados de peroxinitritos, como radical $\bullet\text{OH}$ e ânions 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 dobrado 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.



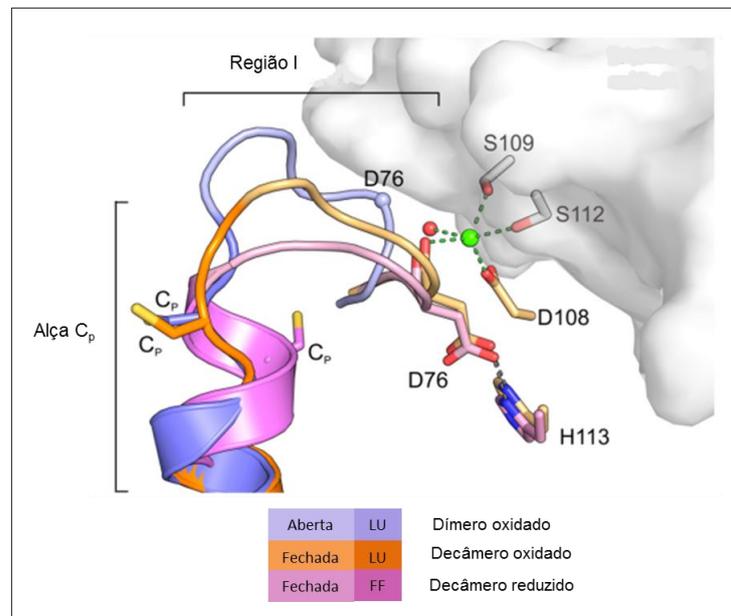
Fonte: Modificado de Teixeira et al., 2015.

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).

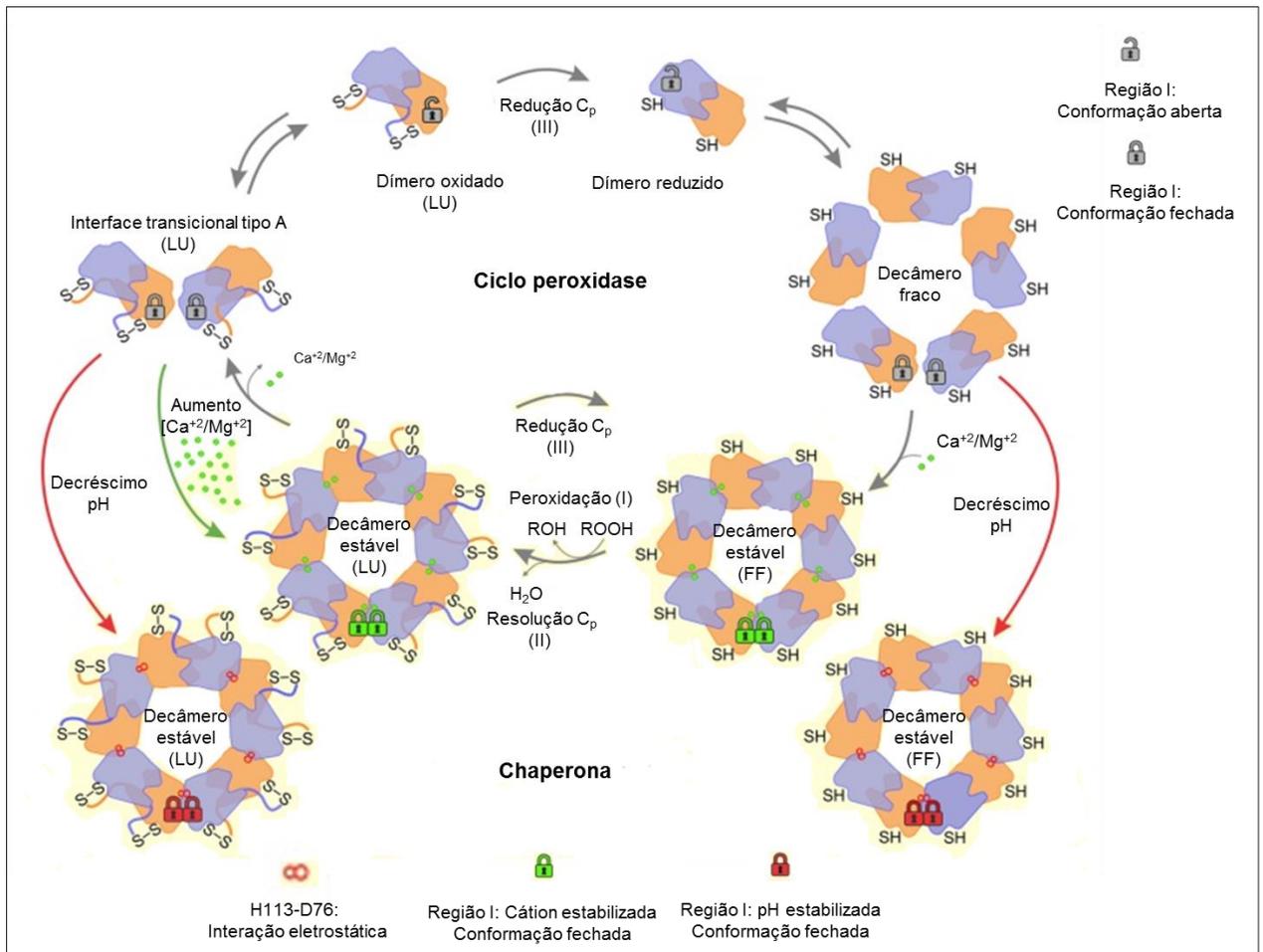
Segundo Morais et al., (2017), TXNPx mitocondrial de *L. infantum* apresenta a forma dimérica quando oxidada e decamérica quando reduzida (Figura 39). Durante o estresse térmico, fase de transição do hospedeiro inseto para o hospedeiro mamífero, ocorre um aumento de Ca^{+2} na mitocôndria, com isso o 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 assumira 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 Morais 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 Morais et al., 2017.

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.; PENNA, 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.; LIPMAN, 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 an 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. Nitrofurane drugs 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. Benzimidazole-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 peroxiredoxina 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.; CICALLELLI, R. M. B.; ISAAC, V. L. B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v. 2, p. 08-14, 2012.

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.

CICALLELLI, 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.; ATTIAS, 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 trypanedoxin 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 tryparedoxin 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 benzimidazole 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.; MIYAHIRA, 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: antioxidant 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 pivotal role 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 innortheast 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* epimastigotas. **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 trypanodioxidase 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.; CERVENŠANSKY, 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.; BASOMBRIO, 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-DARROCHA, J. P.; GARCIA, J. B. F.; MENDES, I. C.; PENA, 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 PROTOZOLOGY, 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.; CICARELLI, R. M. B.; DA ROSA, J. A. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. **Parasitology**, v. 139, p. 37-44, 2012.

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-ČĖNIENĖ, A.; VITĖNIENĖ, I.; ČĖNAS, 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.; ČĖNAS, 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. 8820-8225, 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.