PAMELA OMENA PETRAVICIUS

Busca de novos compostos anti-*Trypanosoma cruzi* e mapeamento da resistência natural a benznidazol em tripanossomatídeos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2018

PAMELA OMENA PETRAVICIUS

Busca de novos compostos anti-*Trypanosoma cruzi* e mapeamento da resistência natural a benznidazol em tripanossomatídeos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof.a D.ra Bianca Silvana Zingales

Versão corrigida

SÃO PAULO

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Omena Petravicius, Pamela
Busca de novos compostos anti-Trypanosoma cruzi e mapeamento da resistência natural a benznidazol em tripanossomatídeos. / Pamela Omena Petravicius; orientadora Bianca Silvana Zingales. -- São Paulo, 2018.
167 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Derivados de quinazolina e de oxadiazol. 2. Resistência natural a benznidazol. 3. Tripanossomatídeos. 4. Nitroredutase I. Old yellow enzyme. Superóxido dismutase dependente de ferro. Transportador ABCG1. 5. Filogenia. I. Silvana Zingales, Bianca, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Pamela Omena Petravicius

Titulo da Dissertação: Busca de novos compostos anti-*Trypanosoma cruzi* e mapeamento da resistência natural a benznidazol em tripanossomatídeos.

Orientadora: Prof.a D.ra Bianca Silvana Zingales

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou a candidata:

( ) Aprovada **( ) Reprovada**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **764/15** referente ao projeto intitulado: "*Quimioterapia para a doença de chagas: avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi de derivados de quinazolina e oxadiol*" sob a responsabilidade de **Pamela Omena Petravicius**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Bianca Silvana Zingales**, do IQ-USP, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de agosto de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A ZANOTTO
Coordenador da CEPSH - ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **839/2016** referente ao projeto intitulado: "***Suscetibilidade a benznidazol em espécies da família Trypanosomatidae e em representantes de clados do gênero Trypanosoma***" sob a responsabilidade de ***Pâmela Omena Petravicius*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Bianca Silvana Zingales,*** do Departamento de Instituto de Química, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora 3 CEPSH ICB/USP

Dedico este trabalho e todo o trajeto que me levou até ele aos que ainda acreditam e se esforçam para que as descobertas científicas sejam divulgadas integralmente e postas em prática.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos sempre me pareceram algo complexo. Porém, chegando ao final dessa etapa, percebo que foram tantas as pessoas que direta ou indiretamente me auxiliaram e tornaram essa minha jornada mais suave, que só posso pensar que "Agradecer" guarda uma relação direta com "Engrandecer". Por isso segue um pequeno rol das pessoas que Engrandeceram meu período de estudo e pesquisas:

À minha orientadora, Prof.a D.ra Bianca Zingales, pela paciência e por ter me ensinado um pouco do seu grande saber como pesquisadora.

À equipe do Laboratório: Marcelo, Solange, Mariana por todo o apoio, pela cumplicidade, por mostrarem que a amizade e a ética prevalecem independentemente da situação.

À Prof.a D.ra Iolanda M. Cuccovia e à M.a Laura Farkuh, por disponibilizarem os compostos (derivados de quinazolina e oxadiazol), e por me ensinarem a utilizar o espectrofotômetro (*Cary 60 UV-Vis – Varian*).

À Prof.a D.ra Maria Júlia M. Alves, por fornecer o meio LIT-Hb.

Ao Prof. D.r Leoberto Tavares, ao João S. Murayama e à D.ra Fanny Palace-Berl, pela colaboração e ensinamentos para medidas da turbidez do meio. Um agradecimento especial à Fanny, pela amizade e pela ajuda no uso do programa *Origin* e na obtenção dos gráficos e pelas discussões proveitosas.

À Secretária Silvia F. Camargo do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por todo o auxílio prestado.

À Prof.a D.ra Marta M. G. Teixeira, pelas culturas de tripanossomatídeos cedidas, pelas sugestões, orientações, interesse e disponibilidade.

À M.a Marta Campaner, pelas recomendações e ensinamentos no cultivo dos parasitos e nos ensaios *in vitro*, e pela amizade.

Ao D.r André Guilherme C. Martins, pela obtenção das sequências, pela confecção das árvores filogenéticas, e pelos ensinamentos.

Ao Prof. D.r Erney F. Plessmann de Camargo, pelo interesse no projeto e pelos questionamentos e sugestões relevantes.

À Prof.a D.ra Silvia Uliana, pela colaboração, por disponibilizar as culturas de *Leishmania*, pelos ensinamentos e pelo apoio à pesquisa.

Ao Prof. D.r Ariel Silber, pelas sugestões nos problemas com ensaios de parasitos que formam rosetas.

Ao Prof. D.r Sérgio Schenkman e à Mariana L. Lima, pela disponibilização da cultura de *Trypanosoma b. brucei* e pelos conselhos quanto ao cultivo e uso desta cultura em ensaios *in vitro*.

À Prof.a D.ra Daniella Bartholomeu e ao João L. R. Cunha, pelas sugestões e interesse, e pela produção das primeiras árvores filogenéticas utilizadas nesta pesquisa.

A todos os membros da minha família, por sempre estarem disponíveis e por trazerem equilíbrio, confiança, harmonia e outros bons sentimentos para minha vida. Mais especificamente, à minha mãe, por me incentivar a ler, viajar, conhecer outras culturas e apreciar as tradições; ao meu pai, por me ensinar a cultivar, desenvolver minha precisão e a defender minhas ideias; ao Daniel, por me apresentar aos jogos cooperativos que desenvolveram nosso pensamento coletivo, visão geral das situações e os impactos das pequenas ações; ao Rafael, por me mostrar a importância da família, do empírico e da persuasão; e à vovó Lydia, por me ensinar a realizar um bom trabalho do começo ao fim.

Aos Filos por toda a amizade, apoio e conversas incentivadoras.

Ao Dimas Diógenes, pelo companheirismo, compreensão e por enfrentar as dificuldades com a razão e com bom humor.

Aos que me receberam em sua morada, pela hospitalidade, suporte e confiança, enquanto estive em São Paulo.

À Ligia e ao Caco, pela companhia e por me ensinarem, dentre muitas coisas, que nem sempre agradar alguém é fazer o bem. Agradeço também à Laura, Luizi, Tia Zizinha e ao Tio Luiz, pela amizade familiar.

Ao Jonatas Rodrigues e ao Marcos Andrino por me fazerem ver além dos títulos.

À Alexandra A. Elbakyan, criadora do site *Sci-Hub*, por disponibilizar acesso livre aos conteúdos científicos.

À Universidade de São Paulo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio à pesquisa.

"Não creia no que os seus olhos lhe dizem. Tudo o que mostram é limitação.

Olhe com o entendimento…"

(Richard Bach)

Este trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

PETRAVICIUS, P. O. Busca de novos compostos anti-*Trypanosoma cruzi* e mapeamento da resistência natural a benznidazol em tripanossomatídeos. 2018. 167 f. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

A busca de novos compostos para o tratamento da doença de Chagas (DC) e o entendimento dos fatores envolvidos na resistência natural de cepas de *Trypanosoma cruzi* a benznidazol (BZ), fármaco de primeira escolha no tratamento da DC, são prioridades de pesquisa. Neste estudo, quatro compostos derivados de quinazolina e quatro de oxadiazol tiveram sua atividade avaliada contra formas epimastigotas de duas cepas de *T. cruzi*. Apenas o composto 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il-tio)-6,7-metoxiquinazolina mostrou atividade tripanocida promissora, com valores de CI_{50} da ordem de 14 µM. Por outro lado, esse composto apresentou elevada citotoxicidade para células LLC-MK2, promovendo a morte de 70% das células na concentração de 5 µM. Esta característica não torna o composto atraente como um candidato a fármaco para a DC. Em seguida, determinamos a sensibilidade a BZ *in vitro* em espécies da família Trypanosomatidae e em representantes de clados do gênero *Trypanosoma*, totalizando 14 organismos. A atividade do composto foi avaliada em parasitos em fase exponencial de crescimento, em meio de cultura e temperaturas adequadas, após incubação de 72h, utilizando o ensaio com o corante de tetrazólio MTT. Foram consideradas espécies sensíveis a BZ aquelas que apresentaram valores de CI_{50} entre 3 e 25 µM: representantes do gênero *Trypanosoma* (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. rangeli* e *T. b. brucei*) e *P. serpens*. Foram consideradas espécies resistentes a BZ aquelas que tiveram uma inibição de crescimento apreciável apenas a partir de 40 µM: representantes do gênero *Leishmania* [*L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) tarentolae* e *L. (L.) enriettii*]; *C. fasciculata*, *A. deanei*, *S. galati*, *T. dionisii* e *Paratrypanosoma* sp. A maior taxa de resistência foi observada nos isolados de *T. dionisii*, *C. fasciculata*, *S. galati*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) enriettii* nos quais a inibição do crescimento promovida por 160 µM de BZ é da ordem de 20%. Um dos fatores que podem estar relacionados com a resistência a BZ em *Leishmania* refere-se à taxa de captação do fármaco, que, em *L. (L.) infantum*, é cerca de 6 vezes menor que em *T. cruzi*. Por sua vez, *P. serpens* (sensível a BZ) apresenta a mesma taxa de captação de *T. cruzi*. Objetivando analisar características de proteínas previamente associadas com a resistência a BZ em *T. cruzi*, resgatamos em bancos de dados de tripanossomatídeos as sequências da Nitroredutase I (NTR), da *Old Yellow Enzyme* (OYE), da Fe-superóxido dismutase A (FeSOD-A) e do transportador ABCG1. Encontramos ortólogos de NTR, FeSOD-A e ABCG1 em todas as espécies. Não encontramos ortólogos de OYE em *P. serpens* e em tripanossomas Africanos. O alinhamento das sequências é aqui mostrado. Árvores filogenéticas foram construídas para as quatro proteínas, observando-se que as árvores da NTR, da FeSOD-A e de ABCG1 seguem o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por marcadores moleculares clássicos. Os dados obtidos neste estudo serão úteis para investigações futuras, visando avaliar a atividade dos marcadores de resistência putativos e/ou o efeito da superexpressão ou silenciamento dos genes correspondentes.

Palavras-chave: Derivados de quinazolina e de oxadiazol. Resistência natural a benznidazol. Tripanossomatídeos. Nitroredutase I. *Old yellow enzyme*. Superóxido dismutase dependente de ferro. Transportador ABCG1. Filogenia.

ABSTRACT

PETRAVICIUS, P. O. Search for new anti-*Trypanosoma cruzi* compounds and mapping of the natural resistance to benznidazole in trypanosomatids. 2018. 167 p. [Dissertation (MSc in Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

The search for new compounds for the treatment of Chagas disease (CD) and the understanding of the elements involved in the natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to benznidazole (BZ), the first choice drug for the treatment of CD, are research priorities. Here, four compounds derived from quinazoline and four from oxadiazol had their activity evaluated against epimastigote forms of two *T. cruzi* strains. Only 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl-thio)-6,7-methoxyquinazoline showed promising trypanocidal activity, with IC_{50} values of ~ 14 μM. On the other hand, this compound had high cytotoxicity to LLC-MK2 cells, promoting the death of 70% of the cells at 5 μM concentration. This feature does not make the compound attractive as a drug candidate for CD. Next, we determined BZ *in vitro* sensitivity in species of the Trypanosomatidae family and in representatives of *Trypanosoma* clades, totalizing 14 organisms. The drug activity was evaluated in parasites in the exponential growth phase, in appropriate culture medium and temperatures, after incubation for 72h, using the MTT tetrazolium dye assay. BZ-susceptible species were considered those that exhibited IC_{50} values from 3 to 25 μM: representatives of the genus *Trypanosoma* (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. rangeli*, and *T. b. brucei*) and *P. serpens*. BZ-resistant species were considered those that had significant growth inhibition only from 40 μM: representatives of the genus *Leishmania* [*L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) tarentolae*, and *L. (L.) enriettii*]; *C. fasciculata*, *A. deanei*, *S. galati*, *T. dionisii* and *Paratrypanosoma* sp. The highest resistance rate was observed in *T. dionisii*, *C. fasciculata*, *S. galati*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) enriettii* isolates, in which 20% growth inhibition was promoted by 160 μM BZ. One of the factors that may be related to BZ resistance in *Leishmania* refers to the rate of drug uptake, which in *L. (L.) infantum* is about 6-fold lower than in *T. cruzi*. In turn, *P. serpens* (sensitive to BZ) presents the same rate of *T. cruzi* uptake. In order to analyze the characteristics of proteins previously associated with BZ-resistance in *T. cruzi*, we retrieved from trypanosomatid databases the sequences of Nitroreductase I (NTR), Old Yellow Enzyme (OYE), Fe-superoxide dismutase A (FeSOD-A) and the ABCG1 transporter. NTR, FeSOD-A and ABCG1 orthologs were found in all species. OYE orthologs were not represented in *P. serpens* and African trypanosomes. Sequence alignments are here presented. Phylogenetic trees were constructed for the four proteins, showing that the NTR, FeSOD-A and ABCG1 trees follow the phylogenetic pattern of evolution of the species obtained by classical molecular markers. The data reported in this study will be valuable for future investigation aimed at assessing the activity of putative drug resistance markers and/or the effect of the overexpression or silencing of the corresponding genes.

Key words: Quinazoline and oxadiazol derivatives. Benznidazole resistance. Trypanosomatids. Nitroreductase I. Old yellow enzyme. Fe-superoxide dismutase. ABCG1 transporter. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*.....31

Figura 02 - Distribuição geográfica de DTUs de *T. cruzi* prevalentes em humanos e das manifestações da DC.....34

Figura 03 - Fórmula estrutural das moléculas de NFX e BZ.....35

Figura 04 - Mecanismo de ação proposto para BZ via ativação por NTR do tipo I.....39

Figura 05 - Mecanismo de ação proposto para BZ via ativação por NTR do tipo II.....40

Figura 06 - Estrutura da Nifuroxazida.....43

Figura 07 - Fórmula estrutural da molécula de quinazolina e quinozolinona.....44

Figura 08 - Esquema da posição de substituintes nos derivados de quinazolina-2,4,6-triamina.....45

Figura 09 - Isômeros de Oxadiazol.....46

Figura 10 - Características dos compostos derivados da quinazolina.....53

Figura 11 - Características dos compostos derivados de oxadiazol.....53

Figura 12 - Esquema do ensaio para determinar a atividade anti-*T. cruzi* dos compostos.....55

Figura 13 - Desenho esquemático da conversão do MTT em formazan.....56

Figura 14 - Relação entre a concentração de parasitos da cepa Silvio X10.cl1 e sua absorbância em meio LIT.....60

Figura 15 - Relação entre a concentração de parasitos da cepa Colombiana e sua absorbância em meio LIT.....60

Figura 16 - Curvas de inibição do crescimento das cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana de *T. cruzi* pelo composto SNR-02-03.....66

Figura 17 - Desenho esquemático para identificação dos valores ideais de CLogP para fármacos.....68

Figura 18 - Mapa do potencial lipofílico dos compostos de Quinazolina e Oxadiazol...69

Figura 19 - Esquema da classificação de gêneros da família Trypanosomatidae.....83

Figura 20 - Cladograma que ilustra o consenso atual das relações filogenéticas de Kinetoplastídeos.....84

Figura 21 - Esquema da distribuição de clados no gênero *Trypanosoma*.....85

Figura 22 - Registro fotográfico e curva de crescimento das cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana.....86

Figura 23 - Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. rangeli*.....87

Figura 24 - Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. dionisii*.....88

Figura 25 - Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. c. marinkellei*.....88

Figura 26 - Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. b. brucei*.....89

Figura 27 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *C. fasciculata*.....90

Figura 28 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *A. deanei*.....91

Figura 29 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *S. galati*.....91

Figura 30 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (L.) infantum*.....93

Figura 31 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (V.) braziliensis*.....93

Figura 32 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (L.) tarentolae*.....94

Figura 33 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (L.) enriettii*.....95

Figura 34 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *P. serpens*.....96

Figura 35 - Registro fotográfico e curva de crescimento de *Paratrypanosoma* sp.....97

Figura 36 - Relação entre a concentração de parasitos e a absorbância do meio de cultura.....99

Figura 37 - Produção de formazan por epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Silvio X10.cl1) vivos e mortos pelo calor.....100

Figura 38 - Curva de inibição do crescimento de espécies do gênero *Trypanosoma* por BZ.....102

Figura 39 - Inibição do crescimento da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* por BZ.....103

Figura 40 - Inibição do crescimento da cepa Colombiana de *T. cruzi* por BZ.....103

Figura 41 - Inibição do crescimento de *T. c. marinkellei* por BZ.....104

Figura 42 - Inibição do crescimento de *T. rangeli* por BZ.....104

Figura 43 - Inibição do crescimento de *T. b. brucei* por BZ.....105

Figura 44 - Inibição do crescimento de espécies dos gêneros *Crithidia*, *Angomonas* *Strigomonas* por BZ.....106

Figura 45 - Inibição do crescimento de espécies do gênero *Leishmania* por BZ.....107

Figura 46 - Inibição do crescimento de *P. serpens* por BZ.....108

Figura 47 - Inibição do crescimento de *Paratrypanosoma* por BZ.....109

Figura 48 - Curvas de inibição do crescimento dos parasitos por BZ.....110

Figura 49 - Localização do domínio *Nitro-FMN reductase superfamily* e sítio de ligação ao FMN e PSORT na sequência proteica da *Tc*NTR do haplótipo Esmeraldo da cepa CL Brener.....115

Figura 50 - Localização do domínio *OYE-like FMN*, sítio de ligação ao FMN, sítio ativo e de ligação ao substrato na sequência proteica de *Tc*OYE no haplótipo não-Esmeraldo da cepa CL Brener.....115

Figura 51 - Localização dos domínios SodA, Sod Fe N e Sod Fe C na sequência proteica de *Tc*FeSOD-A no haplótipo Esmeraldo da cepa CL Brener.....116

Figura 52 - Localização do sítio de ligação a ATP, dos motivos Walker A e Walker B, da assinatura ABC e das regiões transmembrânicas na sequência proteica de *Tc*ABCG1 do haplótipo não-Esmeraldo da cepa CL Brener.....117

Figura 53 - Alinhamento das sequências proteicas de NTR entre os organismos.....120

Figura 54 - Alinhamento das sequências proteicas de OYE entre os organismos.....123

Figura 55 - Alinhamento das sequências proteicas de FeSOD-A entre os organismos.....126

Figura 56 - Alinhamento das sequências proteicas de ABCG1 entre os organismos...128

Figura 57 - Árvore por estimação de máxima verossimilhança de NTR.....133

Figura 58 - Árvore por estimação de máxima verossimilhança de OYE.....134

Figura 59 - Árvore por estimação de máxima verossimilhança de FeSOD-A.....135

Figura 60 - Árvore por estimação de máxima verossimilhança de ABCG1.....136

Figura 61 - Cladograma que ilustra o consenso atual das relações filogenéticas de Kinetoplastídeos.....143

Figura 62 - Árvore de Máxima Verossimilhança, baseada em sequências de proteínas, mostrando a filogenia de tripanosomatídeos.....145

Figura C.1 - Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de espécies representantes do gênero *Trypanosoma*.....165

Figura C.2 - Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de espécies representantes dos gêneros *Crithidia*, *Angomonas* e *Strigomonas*.....165

Figura C.3 - Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de espécies representantes do gênero *Leishmania*.....166

Figura C.4 - Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de *Phytomonas serpens*.....166

Figura C.5 - Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de *Paratrypanosoma* sp.....167

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Membros da família Trypanosomatidae e suas características biológicas.....30

Tabela 02 - Associações de DTUs de *T. cruzi* com hospedeiros silvestres, vetores e localização geográfica.....33

Tabela 03 - Valores de absorbância e de transmitância dos meios LIT-He e LIT-Hb.....59

Tabela 04 - Efeito de derivados de Quinazolina sobre epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1 incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.....61

Tabela 05 - Efeito de derivados de Oxadiazol sobre epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1 incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.....62

Tabela 06 - Efeito de derivados de Quinazolina sobre epimastigotas da cepa Colombiana incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.....63

Tabela 07 - Efeito de derivados de Oxadiazol sobre epimastigotas da cepa Colombiana incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.....63

Tabela 08 - Tempo de geração (em horas) das culturas das cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana em meio LIT-He e LIT-Hb.....64

Tabela 09 - Efeito inibitório do composto SNR-02-03 sobre formas epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1.....65

Tabela 10 - Efeito inibitório do composto SNR-02-03 sobre formas epimastigotas da cepa Colombiana.....65

Tabela 11 - Valores da CI_{50} do composto SNR-02-03 para as cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana.....66

Tabela 12 - Absorbância do formazan produzido por células LLC-MK2 incubadas com diversas concentrações do composto SNR-02-03.....67

Tabela 13 - Características dos parasitos.....75

Tabela 14 - Características dos genes e proteínas *Tc*NTR, *Tc*ABCG1, *Tc*OYE e *Tc*FeSOD-A da cepa CL Brener.....78

Tabela 15 - Genomas de tripanossomatídeos e de *Bodo saltans* utilizados neste estudo.....80

Tabela 16 - Meio de cultura e tempo de geração dos parasitos escolhidos no estudo.....98

Tabela 17 - Equação da reta que correlaciona o número de parasitos e a absorbância do formazan produzido no ensaio do MTT.....101

Tabela 18 - Inibição do crescimento de duas espécies de *Leishmania* por Anfotericina B.....107

Tabela 19 - Valores de CI_{50} para BZ obtidos para parasitos que apresentaram inibição do crescimento que tende à saturação.....110

Tabela 20 - Porcentagem de inibição do crescimento (%IC) promovida por duas concentrações de BZ.....111

Tabela 21 - Captação de BZ por *T. cruzi* e por *L. (L.) infantum*.....112

Tabela 22 - Captação de BZ por *T. cruzi* e por *P. serpens* a 28 °C.....113

Tabela 23 - Domínios conservados selecionados para cada sequência proteica.....114

Tabela 24 - Identidade das sequências proteicas de NTR, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.....119

Tabela 25 - Identidade das sequências proteicas de OYE, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.....122

Tabela 26 - Identidade das sequências proteicas de FeSOD-A, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 (1) de *T. cruzi* como *query*.....125

Tabela 27 - Identidade das sequências proteicas do transportador ABCG1, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.....127

Tabela A.1 - Composição dos meios LIT-He e LIT-Hb.....163

Tabela B.1 - Composição do meio LIT-Es.....164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δabs	Variação da absorbância
Δt	Variação do tempo
ε	Coeficiente de absortividade molar
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Absorbância
ABC	*ATP Binding Cassette* (Cassete de Ligação ATP)
ABCG	Transportador ABC da subfamília G
Abs	Absorbância
AIC	*Akaike Information Criterion* (Critério de Informação de Akaike)
AIDS	*Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AM1	*Austim model 1*
AToL	*Assembly of Tree of Life* (Assembléia da Árvore da Vida)
ATP	Adenosina trifosfato
BOD	*Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BSA	*Bovine Serum Albumin* (Albumina Bovina Sérica)
BZ	Benznidazol
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
CC_{50}	Concentração Citotóxica para metade das células
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CCRP	*Chagas Clinical Research Platform* (Plataforma de Pesquisa Clínica de Chagas)
CDD	*Conserved Domains Database* (Banco de dados de Domínios Conservados)

CI_{50}	*Half maximal Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória média)
CLogP	Coeficiente de partição calculado
cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
DC	Doença de Chagas
DHFR	Enzima Dihidrofolato *redutase*
DIG	Forma Digestiva
DMIP-UNIFESP	Departamento de Microbiologia. Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DND*i*	*Drugs for Neglected Diseases initiative* (iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas)
dp	Desvio-padrão
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTU	*Discrete Typing Unit* (Unidades Discretas de Tipagem)
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
Fe_3^+	Íon férrico
FMN	Mononucleotídeo de Flavina
g	Grama
g	Gravidade
h	Hora
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
gRNA	RNA guia
GSH	Glutationa
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HAT	*Human African Trypanosomiasis* (Tripanossomíase Africana Humana)
HIV	*Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HTS	*High Throughput Screening* (Triagem de Alta Produtividade)
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da USP
IQ-USP	Instituto de Química da USP
IS	Índice de Seletividade
L	Litro
LC	Leishmaniose Cutânea
LIT	*Liver Infusion Triptose* (Infusão de Fígado e Triptose)
LIT-Es	Meio LIT com formulação Especial
LIT-Hb	Meio LIT suplementado com Hemoglobina
LIT-He	Meio LIT suplementado com Hemina
log	Logaritmo
LV	Leishmaniose Visceral
kDNA	*Kinetoplast DNA* (DNA do Cinetoplasto)
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MLE	M*aximum Likelihood Estimation* (Estimação de Máxima Verossimilhança)
mM	Milimolar
MM2	Campo de força empírico
MM+	Campo de força derivado do MM2
MSA	*Multiple Sequence Alignment* (Alinhamento Múltiplo de Sequências)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil Tetrazólio
NAD(P)H	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fostato reduzida
NCBI	*National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
nDNA	DNA nuclear
NF	Nifuroxazida
NFX	Nifurtimox

nm	Nanômetro
NTR	Nitroredutase
NSF	*National Science Foundation* (Fundação Nacional de Ciências)
O_2	Oxigênio molecular
O_2^-	Ânion superóxido
OH^-	Radical livre hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	*Open Reading Frame* (Fase de Leitura Aberta)
OYE	*Old Yellow Enzyme* (Enzima Amarela Velha)
PA	*Pro-analyse* (Reagente Grau Analítico)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCDCh	Programa de Controle da Doença de Chagas
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso molecular
PTR	Pteridina *redutase*
R^2	Coeficiente de determinação
RAxML	*Randomized Axelerated Maximum Likelihood* (Máxima Verossimilhança Aleatória Axelerada)
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Resistência Selecionada
SFB	Soro Fetal Bovino
SNPs	*Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)
SOD	Superóxido Dismutase
TCC	*Trypanosomatid Culture Collection* (Coleção de Culturas de Tripanossomatídeos)
TG	Tempo de Geração
$T(SH)_2$	Tripanotiona
USP	Universidade de São Paulo

%IC	Porcentagem de Inibição do Crescimento
%T	Porcentagem de Transmitância

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....28

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS.....28

1.2 O AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....29

1.3 QUIMIOTERAPIA PARA A DOENÇA DE CHAGAS.....34

1.4 HISTÓRICO DO USO DE BENZNIDAZOL PARA O TRATAMENTO DA DC.....36

1.5 MECANISMOS DE AÇÃO DO BENZNIDAZOL.....37

1.6 NOVOS TRATAMENTOS PARA A DOENÇA DE CHAGAS.....41

1.6.1 Derivados da Nifuroxazida.....43

1.6.2 Derivados da Quinazolina.....44

1.6.3 Derivados de Oxadiazol.....45

1.7 QUIMIOTERAPIA PARA OUTROS PARASITOS DA FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE E SENSIBILIDADE A BENZNIDAZOL.....46

2 JUSTIFICATIVA.....50

3 SUBPROJETO 1: ATIVIDADE ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA E DE OXADIAZOL.....52

3.1 OBJETIVOS.....52

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....53

3.2.1 Compostos.....53

3.2.2 Soluções estoque dos compostos.....53

3.2.3 Cepas de T. cruzi.....54

3.2.4 Ensaio para determinação da atividade anti-T.cruzi.....54

3.2.5 Ensaio para determinar a citotoxicidade para células de mamífero em cultura.....55

3.2.6 Modelos moleculares tridimensionais dos derivados de quinazolina e oxadiazol e determinação do coeficiente de partição.....56

3.3 RESULTADOS.....58

3.3.1 Determinação da atividade anti-T. cruzi de compostos derivados de quinazolina e oxadiazol.....58

3.3.1.1 Determinação do comprimento de onda ideal do meio de cultura para monitorar a atividade dos compostos.....58

3.3.1.2 Relação entre a concentração de parasitos e absorbância do meio de cultura.....59

3.3.1.3 Atividade dos derivados de quinazolina e de oxadiazol contra formas epimastigotas.....61

3.3.1.4 Determinação da CI_{50} do composto SNR-02-03.....65

***3.3.2 Avaliação da citotoxicidade do composto SNR-02-03 para células LLC-MK2*.....66**

***3.3.3 Análise do coeficiente de partição dos derivados de quinazolina e oxadiazol e modelos moleculares tridimencionais*.....67**

3.4 CONCLUSÕES.....70

4 SUBPROJETO 2: SENSIBILIDADE A BENZNIDAZOL EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE E EM REPRESENTANTES DO GÊNERO *TRYPANOSOMA*. ANÁLISE DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A BZ.....71

4.1 JUSTIFICATIVA.....71

4.2 OBJETIVOS.....73

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....74

***4.3.1 Organismos*.....74**

4.3.1.1 Curvas de crescimento e cálculo do tempo de geração.....74

4.3.1.2 Obtenção de imagens dos organismos.....74

***4.3.2 Sensibilidade a BZ*.....76**

4.3.2.1 Sensibilidade a BZ determinada com o ensaio do MTT.....76

4.3.2.2 Cálculo CI_{50} para BZ.....76

***4.3.3 Captação de BZ*.....76**

***4.3.4 Análises Filogenéticas*.....77**

4.3.4.1 Características das proteínas utilizadas.....77

4.3.4.2 Análise e alinhamento das sequências.....78

4.3.4.3 Reconstrução de genealogias.....81

4.4 RESULTADOS.....82

***4.4.1 Organismos e condições de cultivo*.....82**

4.4.1.1 Gênero Trypanosoma.....85

4.4.1.1.1 *Trypanosoma cruzi*.....86

4.4.1.1.2 *Trypanosoma rangeli*.....86

4.4.1.1.3 *Trypanosoma dionisii*.....87

4.4.1.1.4 *Trypanosoma cruzi marinkellei*.....88

4.4.1.1.5 *Trypanosoma brucei brucei*.....89

4.4.1.2 Gêneros Crithidia, Angomonas e Strigomonas.....*89*

4.4.1.2.1 *Crithidia fasciculata*.....90

4.4.1.2.2 *Angomonas deanei*.....90

4.4.1.2.3 *Strigomonas galati*.....91

4.4.1.3 Gênero Leishmania.....*92*

4.4.1.3.1 *Leishmania (L.) infantum*.....92

4.4.1.3.2 *Leishmania (V.) braziliensis*.....93

4.4.1.3.3 *Leishmania (L.) tarentolae*.....94

4.4.1.3.4 *Leishmania (L.) enriettii*.....94

4.4.1.4 Gênero Phytomonas.....*95*

4.4.1.4.1 *Phytomonas serpens*.....95

4.4.1.5 Gênero Paratrypanosoma.....*96*

4.4.1.5.1 *Paratrypanosoma* sp.....96

4.4.1.6 Resumo das condições de cultivo e valor dos tempos de geração dos tripanossomatídeos.....*97*

4.4.2 Sensibilidade a BZ*.....*99

4.4.2.1 Escolha das condições de ensaio para avaliar a sensibilidade a BZ.....*99*

4.4.2.2 Padronização do ensaio do MTT para cada espécie de tripanossomatídeo.....*100*

4.4.2.3 Determinação da CI_{50} para BZ.....*101*

4.4.2.3.1 Gênero *Trypanosoma*.....102

4.4.2.3.2 Gêneros *Crithidia, Angomonas* e *Strigomonas*.....105

4.4.2.3.3 Gênero *Leishmania*.....106

4.4.2.3.4 Gênero *Phytomonas*.....108

4.4.2.3.5 Gênero *Paratrypanosoma*.....108

4.4.2.4 Resumo dos Resultados de sensibilidade a BZ.....*109*

4.4.3 Captação de Benznidazol*.....*111

4.4.4 Análise de sequências de marcadores potencialmente envolvidos na sensbilidade/resistência a BZ*.....*113

4.4.4.1 Busca e análise das sequências da NTR, OYE, FeSOD-A e ABCG1.....*113*

4.4.4.2 Sequências proteicas aceitas.....*117*

4.4.4.3 Análise e alinhamento das sequências.....*118*

4.4.4.3.1 NTR.....118

4.4.4.3.2 OYE.....122

4.4.4.3.3 FeSOD-A.....125

4.4.4.3.4 ABCG1.....127

4.4.4.4 *Reconstrução de genealogias*.....*130*

5 DISCUSSÃO.....137

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....150

APÊNDICE A - Composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi*.....163

APÊNDICE B - Composição do meio LIT-Es.....164

APÊNDICE C - Curvas de absorbância de formazan pela concentração de parasitos.....165

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) foi descrita por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909. Esta descoberta representa um marco histórico na medicina brasileira, pois este sanitarista foi o único cientista na história da medicina de nosso país a descrever integralmente uma doença infecciosa, o patógeno, o inseto vetor, os hospedeiros mamíferos, as manifestações clínicas e a epidemiologia do parasito.

A DC é endêmica em 21 países da América Latina e, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO: *World Health Organization*), o número de pessoas infectadas no mundo está em torno de sete a oito milhões (OMS, 2017a). Estatísticas publicadas em 2012 indicam que cerca de 14 000 mortes ocorrem anualmente na América Latina (MARTINS-MELO et al. 2012).

Por se tratar de uma doença infecciosa endêmica, a qual afeta populações com baixo poder aquisitivo, a DC faz parte da lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), para as quais os investimentos em pesquisas para seu combate são ainda escassos (OMS, 2017b).

A transmissão da DC pode ocorrer via insetos vetores, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, de forma congênita, em acidente laboratorial ou por via oral, caso seja ingerido alimento contaminado (OPAS, 2009). Em março de 2000, o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) concedeu a certificação para alguns Estados brasileiros por terem conseguido eliminar a transmissão da DC pelo vetor *Triatoma infestans* (RAMOS; CARVALHO, 2001). Em 2006, a OMS certificou a eliminação da transmissão da DC por via transfusional e pelo *T. infestans* no Brasil (FERREIRA; SILVA, 2006; MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

A transmissão congênita ou transplacentária pode ocorrer em qualquer período de gestação, com maior frequência no último trimestre, ou durante o parto (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014). Nos últimos anos, vários relatos descreveram microepidemias e surtos de DC aguda em algumas regiões do Brasil, Venezuela e Colômbia, atribuídas à infecção oral (YOSHIDA et al. 2008).

Com a globalização, houve aumento da migração de pessoas infectadas e aparecimento de complicações da doença em imigrantes da América Latina vivendo em países onde a DC não é endêmica e não há vetores. Nestes países, a transmissão pode ocorrer

via transfusão sanguínea, congênita ou por transplante de órgãos (OPAS, 2009; COURA; VIÑAS, 2010).

A DC apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é assintomática na maior parte dos indivíduos. Nos indivíduos sintomáticos podem ocorrer os seguintes sintomas: mal-estar, febre prolongada, aumento do fígado, baço e nódulos linfáticos, edema subcutâneo e, nos casos nos quais houve transmissão da infecção por via vetorial, pode ser observado o sinal de Romaña, quando a picada do inseto triatomíneo ocorrer próxima ao olho (RASSI et al. 2010). Na fase aguda, a parasitemia é elevada e pode ser diagnosticada por exame microscópico do sangue, sorologia para IgG e IgM, reação em cadeia da polimerase (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) (principalmente na fase crônica) ou por exames parasitológicos (xenodiagnóstico e hemocultura). Após a infecção, o sistema imune do indivíduo é ativado e sua resposta induz a redução da parasitemia, mas não a cura.

Passada a fase aguda, que pode durar de um a dois meses, inicia-se a fase crônica, com quadros clínicos muito variáveis, indo desde a infecção assintomática, até casos graves da doença que podem levar à morte. Cerca de 60 a 70% dos indivíduos não desenvolvem manifestações clínicas (forma indeterminada). Por outro lado, 30 a 40% dos pacientes irão desenvolver manifestações cardíacas (cardiomiopatia chagásica), digestivas (megacólon e/ou megaesôfago) ou mistas (cardiodigestivas) (RASSI et al. 2010). Este fato, aliado aos longos períodos de sofrimento e a uma vida de incapacitação, comum entre pacientes crônicos, têm grande impacto na produtividade (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010).

1.2 O AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A DC é uma enfermidade causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, cujo nome é uma homenagem ao D.r Oswaldo Gonçalves Cruz por sua contribuição na primeira infecção experimental feita com este parasito, cuja identificação, como uma espécie nova, foi feita por Carlos Chagas (SOUZA, 1999). Este parasito é um protozoário flagelado, que pertence ao reino Protozoa, infrarreino Excavata, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. Esse gênero é constituído por espécies cujo ciclo evolutivo é heteroxênico ou digenético, oscilando entre hospedeiros invertebrados e vertebrados. Na Tabela 01 são descritos os membros da família Trypanosomatidae e algumas de suas características.

Os hospedeiros invertebrados, principais vetores do *T. cruzi*, são insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como "barbeiros", e distribuídos por todo o continente americano. Mais de 72 espécies foram encontradas com infecção natural pelo parasito, sendo as espécies dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* os principais vetores envolvidos na transmissão do *T. cruzi* (OPAS, 2009; MALAFAIA; RODRIGUES, 2010; SIQUEIRA-BATISTA et al. 2011; OMS, 2017b).

Tabela 01: Membros da família Trypanosomatidae e suas características biológicas. Adaptado de Stevens et al. (2001).

Gênero	Morfologia	Hospedeiros	Vetores	Tipo de ciclo
Bastocrithidia	Epimastigota, amastigota, cisto	Insetos, carrapatos	-	Monogenéticos
Crithidia	Coanomastigota	Insetos	-	
Herpetomonas	Promastigota, opistomastigota	Insetos	-	
Leptomonas	Promastigota, cisto	Insetos, nematodas, ciliados	-	
Rhynchoidomonas	Tripomastigota - sem membrana ondulante	Díptera	-	
Endotrypanum	Amastigota, promastigota, epimastigota, tripomastigota	Preguiças	Flebotomíneos	Digenéticos
Leishmania	Amastigota, promastigota	Mamíferos e lagartos	Flebotomíneos	
Phytomonas	Promastigota	Plantas floridas	Hemípteras	
Trypanosoma	Amastigota, epimastigota, tripomastigota	Vertebrados	Artrópodes, Sanguessugas	

O *T. cruzi* tem um amplo espectro de hospedeiros mamíferos, sendo reportada a infecção em mais de 150 espécies. Todos os mamíferos são considerados sensíveis à infecção, enquanto aves e répteis, aparentemente, não são sensíveis. Marsupiais e tatus são os reservatórios silvestres mais importantes, enquanto cães, gatos, ratos e camundongos atuam como reservatórios domésticos (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000; OPAS, 2009; SIQUEIRA-BATISTA et al. 2011).

No homem, o ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 01) se inicia quando o vetor triatomíneo, ao se alimentar do sangue do hospedeiro, elimina em suas fezes e urina o parasito em sua forma alongada (tripomastigotas metacíclicos). Os metacíclicos infectam o hospedeiro através de mucosas ou ferimentos da pele. As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre

outras. No citoplasma das células, a forma tripomastigota se diferencia na forma arredondada (amastigota) que prolifera por vários ciclos de fissão binária. Em seguida, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e são liberadas pela ruptura das células. Ao atingir a corrente sanguínea, as formas tripomastigotas são disseminadas para diversos órgãos, invadindo vários tipos celulares onde realizam seu ciclo intracelular. Se um triatomíneo picar um hospedeiro infectado, ao ingerir seu sangue, poderá se contaminar, tornando-se vetor da doença (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000; OPAS, 2009; MURCIA et al. 2013).

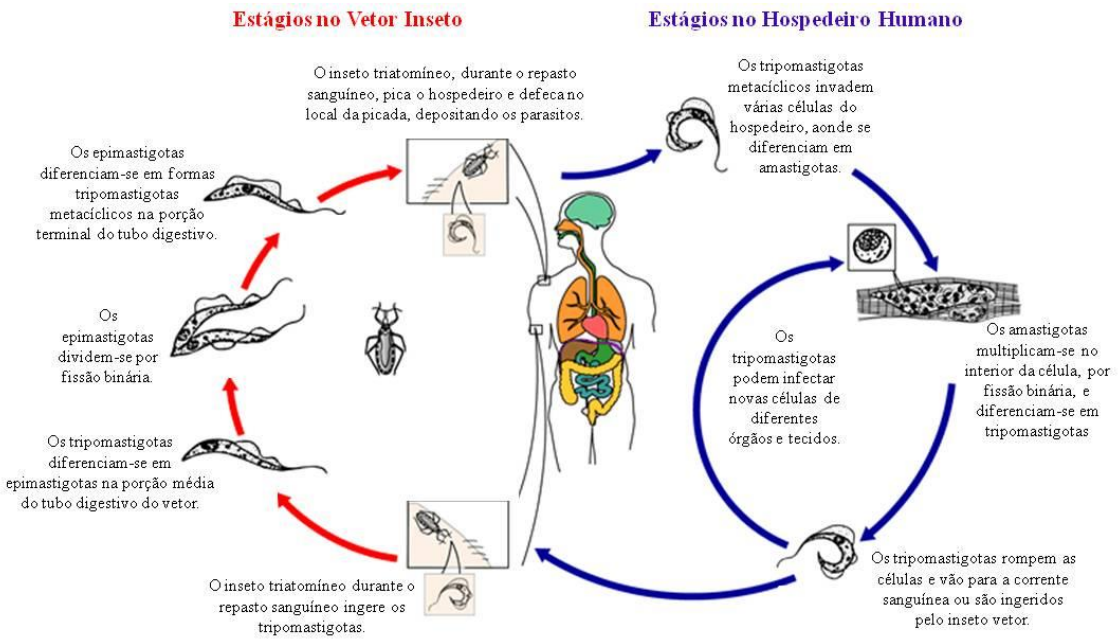


Figura 01: Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de CDC (2017).

O genoma de *T. cruzi* está distribuído no núcleo (nDNA) e na mitocôndria única, numa estrutura denominada cinetoplasto. O DNA mitocondrial é conhecido como kDNA (*kinetoplast* em inglês). O nDNA do *T. cruzi* é composto por três tipos de sequências: as codificadoras de proteínas; as codificadoras de RNA e as não codificadoras. Muitas destas sequências são repetitivas (EL-SAYED et al. 2005). O kDNA representa cerca de 20 a 25% do DNA total do parasito. Está arranjado em dois tipos de moléculas circulares: os minicírculos e o maxicírculo. O maxicírculo corresponde ao genoma mitocondrial, contendo genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs) e subunidades dos complexos da cadeia respiratória. Curiosamente, os transcritos de vários genes codificadores de proteína precisam ser processados. Nesse processamento atuam RNAs guia (gRNAs) codificados pelos

minicírculos. Em função de sua abundância, os minicírculos têm sido empregados em testes diagnósticos por PCR (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

T. cruzi é um complexo de isolados que apresentam diferenças biológicas, bioquímicas e imunológicas. Estudos de genética de população forneceram evidências convincentes de que *T. cruzi* é um organismo diploide, que possui uma estrutura populacional clonal, na qual diferentes clones evoluem por reprodução clonal (fissão binária) e pelo acúmulo de mutações discretas (TIBAYRENC et al. 1986). Inicialmente, postulou-se que esse modelo não seria afetado por eventos de trocas genéticas que seriam raros (TIBAYRENC; AYALA, 2002). No entanto, a análise de uma série de marcadores nucleares e do kDNA mostrou que eventos de recombinação entre isolados do parasito são frequentes e são responsáveis pela estrutura de diversas populações de *T. cruzi* (ZINGALES et al. 2012; MESSENGER; MILES, 2015).

Isolados de *T. cruzi*, também denominados cepas, apresentam diferenças em parâmetros biológicos, como virulência, patogenicidade e especificidade para hospedeiros mamíferos, o que estimulou a busca por marcadores moleculares que fossem capazes de reunir os isolados em grupos discretos, possibilitando esclarecer suas características epidemiológicas (ZINGALES et al. 1999). A partir da década de 70, vários laboratórios desenvolveram estudos nesse sentido, resultando na definição de grupos de isolados que receberam diferentes denominações. Visando homogeneizar a nomenclatura dos grupos e permitir a comunicação entre pesquisadores que trabalham em DC, um Comitê de Expertos recomendou que o táxon de *T. cruzi* fosse dividido em seis grupos TcI-TcVI (ZINGALES et al. 2009), denominados unidades discretas de tipagem (DTU: *Discrete Typing Unit*), onde a DTU é definida como um conjunto de isolados identificados por marcadores moleculares comuns (TIBAYRENC, 1998). Mais recentemente, com base numa série de marcadores moleculares, populações de parasitos restritas a morcegos (Tcbat) (MARCILI et al. 2009) foram consideradas a sétima DTU, denominada Tcbat (LIMA et al. 2015).

Graças ao desenvolvimento de esquemas de tipagem molecular simples (ZINGALES et al. 2012), que podem ser praticados em laboratórios de países de doença endêmica, foi possível estabelecer a distribuição geográfica e eco-epidemiológica das DTUs (Tabela 02).

Tabela 02: Associações de DTUs de *T. cruzi* com hospedeiros silvestres, vetores e localização geográfica. Adaptado de Zingales et al. (2012) e Lima et al. (2015).

DTUs	Hospedeiros silvestres	Vetores	Localização
TcI	Principalmente gambás	Espécies de *Rhodnius*	América do Norte, Central e Sul
TcII	Pouco conhecidos. Alguns primatas e tatus	*Triatoma infestans*	Países do Cone Sul
TcIII	Principalmente tatus	*P. geniculatus*	América do Sul
TcIV	Primatas e quatis	*Rhodnius, Panstrongylus, Triatoma*	América do Norte e Sul
TcV	Pouco conhecidos	Pouco conhecidos	Países do Cone Sul, Gran Chaco e extremo sul do Brasil
TcVI	Pouco conhecidos	Pouco conhecidos	Países do Cone Sul e Gran Chaco
Tcbat	Morcegos	Cimicídios	Brasil, Panamá e Colômbia

Na Figura 02 apresenta-se a distribuição geográfica das DTUs prevalentes em humanos desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (ZINGALES, 2017). Na figura, a linha tracejada separa as regiões geográficas de acordo com as patologias da DC: cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e forma digestiva (DIG).

TcI é prevalente em pacientes do México, países da América Central, países Andinos, e na Amazônia. As apresentações clínicas promovidas por TcI incluem cardiomiopatias severas, sendo rara a forma digestiva. Nos países do Cone Sul, TcII, TcV e TcVI são os principais responsáveis pela DC. TcII predomina no Brasil central e no leste do país; TcV na Argentina, Bolívia e Paraguai, e TcVI na região do Grão Chaco (ZINGALES et al. 2012). No Cone Sul, a cardiomiopatia chagásica pode ser severa e um número de pacientes, que varia de acordo com a região geográfica, pode desenvolver megacólon e megaesôfago.

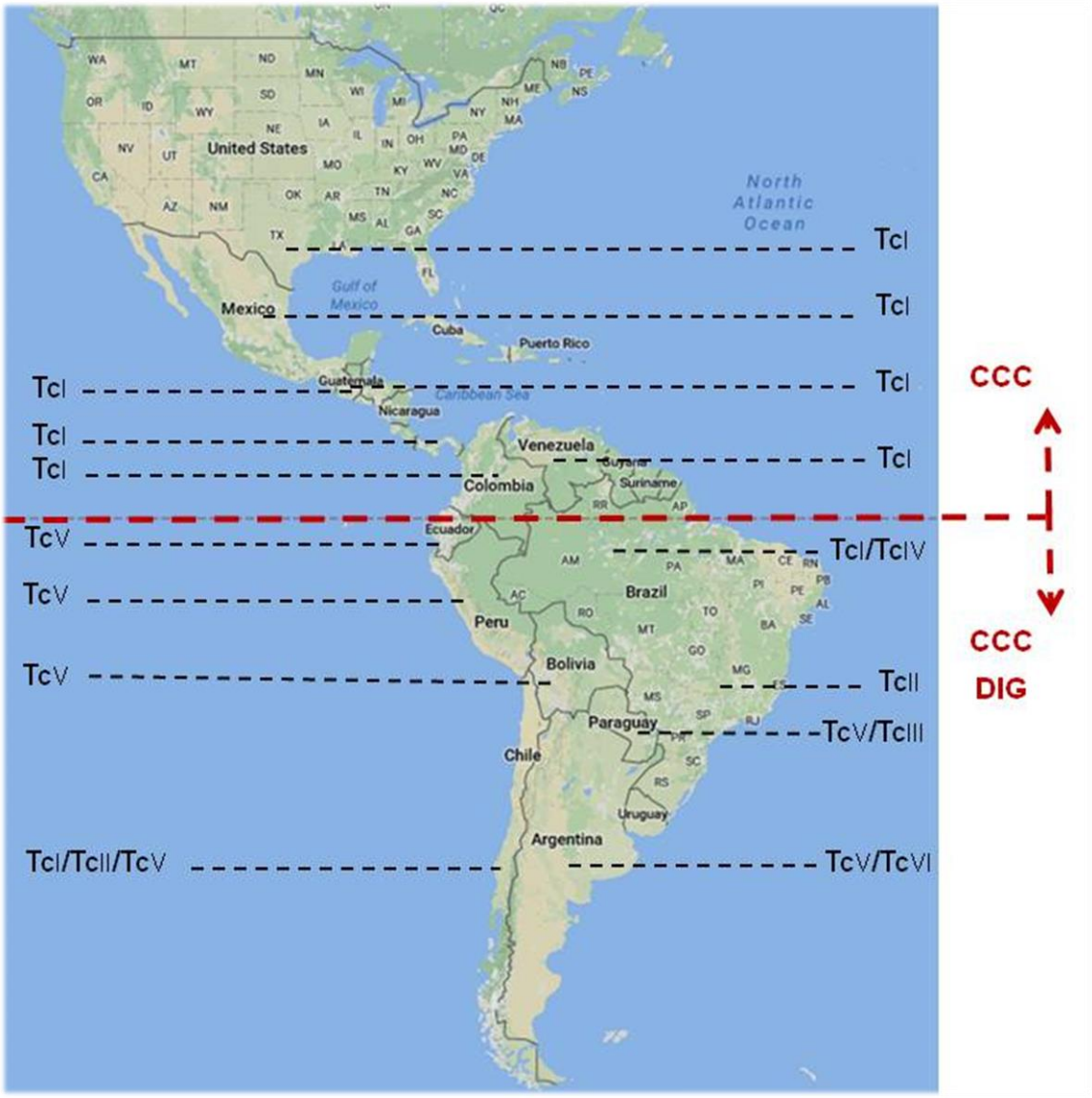


Figura 02: Distribuição geográfica de DTUs de *T. cruzi* prevalentes em humanos e das manifestações da DC. CCC: cardiomiopatia chagásica crônica; DIG: forma digestiva. Adaptado de Zingales (2017).

O conhecimento da epidemiologia molecular do *T. cruzi* é uma etapa importante para o desenho de estratégias de controle da DC e a busca de novos tratamentos para esta doença.

1.3 QUIMIOTERAPIA PARA A DOENÇA DE CHAGAS

As opções de tratamento da DC estão limitadas a dois fármacos nitroheterocíclicos: Benznidazol (BZ) (Rochagan/LAFEPE e Abarax/ELEA) e Nifurtimox (NFX) (LAMPIT/Bayer) (Figura 03).

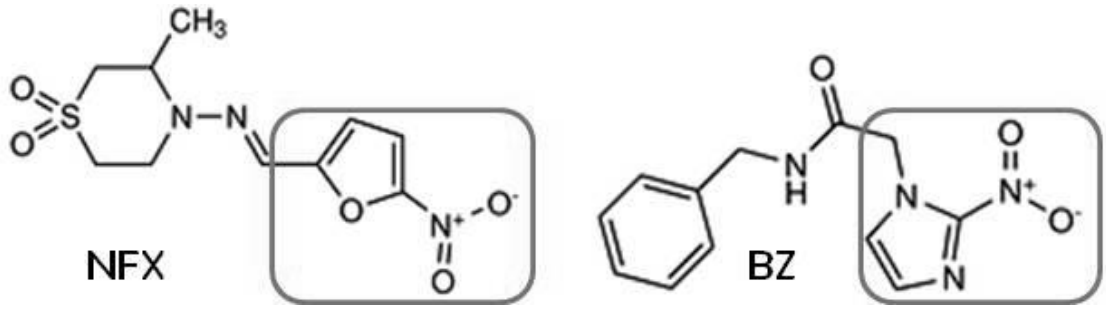


Figura 03: Fórmula estrutural das moléculas de NFX e BZ. A localização do grupo nitro é indicada.

De acordo com diretrizes do Ministério da Saúde (2005), o tratamento com esses quimioterápicos é recomendado em todos os casos de fase aguda, nos acidentes laboratoriais e nas formas congênitas. Na fase crônica, recomenda-se o tratamento em crianças de até 12 anos e em idosos; nos coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV: *Human Immunodeficiency Virus*) que desenvolveram síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*); e nos pacientes chagásicos que estão recebendo medicamentos imunossupressores devido a transplantes. Por outro lado, vários pesquisadores acreditam que todos os pacientes crônicos assintomáticos devam ser tratados a fim de reduzir a probabilidade de virem a desenvolver as patologias da DC como também para dificultar a transmissão do parasito (RASSI et al. 2010).

Ambos os medicamentos apresentam efeitos colaterais, que podem determinar a interrupção do tratamento. Esses efeitos incluem dermatite alérgica, prurido, febre e intolerância gastrointestinal, entre outros (CHATELAIN, 2015). Outros fatores críticos para o uso do NFX e BZ são a baixa taxa de cura no tratamento da doença crônica (~20 a 30% de cura parasitológica) e a longa duração do tratamento (60 dias para BZ e 90 a 120 dias para NFX). BZ é considerado o tratamento de primeira linha, enquanto NFX, devido aos efeitos colaterais mais sérios, está reservado para pacientes que não toleram o BZ (MURCIA et al. 2013; BERMUDEZ et al. 2016).

As razões para as falhas terapêuticas não são conhecidas, mas podem ser resultantes de diferenças na sensibilidade das cepas do parasito aos fármacos (resistência natural, ver abaixo); dificuldade de acesso da droga ao parasito intracelular (URBINA, 2010) e/ou características genético-imunológicas do paciente (YUN et al. 2009).

A diversidade de sensibilidade a BZ e NFX entre as cepas do parasito está amplamente ilustrada em sistemas *in vitro* e em modelos de infecção experimental (FILARDI;

BRENER, 1987; MURTA et al. 1998; DE ORNELAS TOLEDO et al. 2003; entre outros). Em trabalho seminal, Filardi e Brener (1987) investigaram a eficácia do tratamento com BZ e NFX na fase aguda da infecção murina com 47 cepas de *T. cruzi*, derivadas de humanos, vetores e reservatórios silvestres. Os autores concluíram que, dependendo da cepa, as taxas de cura variavam de zero a 100%. Utilizando um valor de corte de 50% de cura, os autores classificaram as cepas em sensíveis e naturalmente resistentes aos fármacos. A designação "naturalmente resistente" deve ser entendida como "resistência inata" para diferenciá-la da "resistência selecionada por pressão com o fármaco". A emergência da resistência aos fármacos disponíveis é um problema global muito sério que afeta doenças em geral.

Embora seja prioritária a busca de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, o entendimento das causas que determinam a resistência natural aos únicos fármacos disponíveis é também de elevada relevância.

1.4 HISTÓRICO DO USO DE BENZNIDAZOL PARA O TRATAMENTO DA DC

Tendo em vista que um dos objetivos do presente estudo é investigar a evolução da sensibilidade a BZ em alguns tripanossomatídeos, foi feita, a seguir, uma breve revisão da descoberta do uso de BZ no tratamento da DC e do possível mecanismo de ação desse fármaco.

A utilização do BZ para o tratamento da DC é decorrente de um longo histórico de descobertas após a descrição da DC por Carlos Chagas em 1909. Segundo consta, em 1933 foi feita a primeira tentativa de tratar camundongos infectados utilizando derivados de bismuto, e em 1937 foram testadas bisquinaldinas neste mesmo modelo animal (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000). No entanto, em 1949 foram reportadas diferenças na resistência natural de duas cepas de *T. cruzi* para derivados de bisquinaldina (BRENER, 1984). Durante e após a Segunda Guerra Mundial diversos fármacos foram testados para o tratamento da DC em animais de laboratório e em pacientes infectados, sem, no entanto, haver a cura parasitológica (BRENER, 1975). Em 1967, foram testados derivados de 2-nitroimidazol, dos quais, um, o BZ, apresentou boa atividade contra *T. cruzi* (BRENER, 1984). Este princípio ativo passou a ser comercializado pela ROCHE, para o tratamento da DC, por volta de 1970.

1.5 MECANISMOS DE AÇÃO DO BENZNIDAZOL

Em 1978, Polak e Richle estudaram o efeito do BZ contra formas epimastigotas de *T. cruzi* e concluíram que cerca de 5 µg/mL de BZ são necessários para provocar 50% de danos ao parasito durante um período de incubação de três dias. Os autores relatam efeitos letais em um curto período de tempo sobre parasitos presentes no sangue de camundongos tratados com concentrações elevadas de BZ (100 µg/mL). Também notaram que, nas mesmas concentrações de BZ, a respiração do parasito não era inibida imediatamente, pois nas primeiras horas ocorria um aumento do consumo de oxigênio, seguido de um declínio após as seis primeiras horas até se manter constante após 49h. Nessa condição, os parasitos respiravam aproximadamente 50% menos do que no início do ensaio. Os autores não detectaram respiração anaeróbia significativa. Para determinar se o BZ atuaria na formação de constituintes celulares vitais, Polak e Richle (1978) analisaram o efeito do fármaco na síntese de proteínas, RNA e DNA, e concluíram que o BZ inibe principalmente a síntese proteica e de RNA.

Diversos pesquisadores acrescentaram informações a respeito do mecanismo de ação de BZ. Moreno e colaboradores (1982) mostraram que o consumo de oxigênio aumenta em microssomos hepáticos de ratos quando BZ é adicionado à mistura reacional contendo NAD(P)H (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida). Além disso, os autores verificaram a participação da NAD(P)H-citocromo P450 *redutase* no processo. Curiosamente, foi verificado que BZ inibe o crescimento de *T. cruzi* em concentrações que não estimulam a formação de oxigênio molecular (O_2), nem a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sugerindo que o efeito tripanocida não depende do efeito dos radicais de oxigênio (MORENO et al. 1982).

Em contrapartida, Díaz de Toranzo et al. (1988) mostraram que formas epimastigotas de *T. cruzi* metabolizam o BZ, o que resulta em sua ativação e, subsequente ligação dos metabólitos reativos em DNA, proteínas e lipídios.

Stoppani (1983) estudou a captação (*uptake*) e o metabolismo de NFX em três cepas de *T. cruzi* e sugeriu que diferenças na captação do fármaco podem ser responsáveis por diferenças na sensibilidade. Estudos análogos com BZ não foram realizados por este autor.

Os conhecimentos atuais indicam que BZ é uma pró-droga que necessita ser ativada por nitroredutases do parasito para exercer os efeitos tripanocidas. Duas classes de nitroredutases (NTR), de tipo I e de tipo II, podem catalisar a redução do grupo nitro ligado ao

anel aromático do fármaco (CAMPOS et al. 2014; WILKINSON; KELLY, 2009; HALL; WILKINSON; 2012). O comprometimento da atividade destas enzimas por mutações ou deleção gênica pode conferir resistência ao BZ (BERMUDEZ et al. 2016; CAMPOS et al. 2014).

Em *T. cruzi* e *T. brucei* as NTRs de tipo I são mitocondriais e, aparentemente, têm origem bacteriana (WILKINSON et al. 2008). Essas enzimas contêm como grupo prostético o mononucleotídio de flavina (FMN) e catalisam a transferência de dois elétrons para o substrato alvo, formando um intermediário nitroso. Em seguida, as NTRs promovem uma segunda redução de dois elétrons para gerar uma hidroxilamina utilizando NAD(P)H como coenzima (Figura 04). Ensaios *in vitro* com BZ e a enzima recombinante de *T. cruzi* e de *T. b. brucei* mostram que a hidroxilamina é convertida, via intermediários de nitrênio e hidroxi, em dihidro-di-hidroxiimidazol, o qual se dissocia produzindo o agente glioxal que é citotóxico e mutagênico (Figura 04) (HALL; WILKINSON; 2012). Por outro lado, a análise por espectrometria de massa dos metabólitos formados *in vivo* após incubação de formas epimastigotas com BZ não mostrou a formação de glioxal, mas sim, a redução dos níveis de vários tióis e o aumento de adutos formados entre os produtos da redução de BZ e tióis de baixo peso molecular (TROCHINE et al. 2014). Com base nesses dados e uma vez que os estudos *in vitro* mostraram que a produção de glioxal é lenta (HALL; WILKINSON; 2012) é improvável que a ação de BZ ocorra via produção de glioxal (PATTERSON; WYLLIE, 2014).

A NTR de tipo I de *T. cruzi* (*Tc*NTR) foi implicada na resistência a BZ obtida por pressão seletiva *in vitro* (WILKINSON et al. 2008; MEJIA et al. 2012). Clones de uma cepa Colombiana obtidos a partir deste processo apresentaram perda da atividade da *Tc*NTR, seja por perda de um dos alelos gênicos, seja por mutações *missense* na região central da fase aberta de leitura do gene (MEJIA et al. 2012). No entanto, tais alterações no gene da *Tc*NTR não foram observadas em isolados de *T. cruzi* naturalmente resistentes a BZ (MEJIA et al. 2012). Isto sugere que os dois processos de resistência ao fármaco (natural e selecionada *in vitro*) ocorram por mecanismos diferentes e que outros fatores, além da *Tc*NTR, atuariam na resistência (CAMPOS et al. 2014).

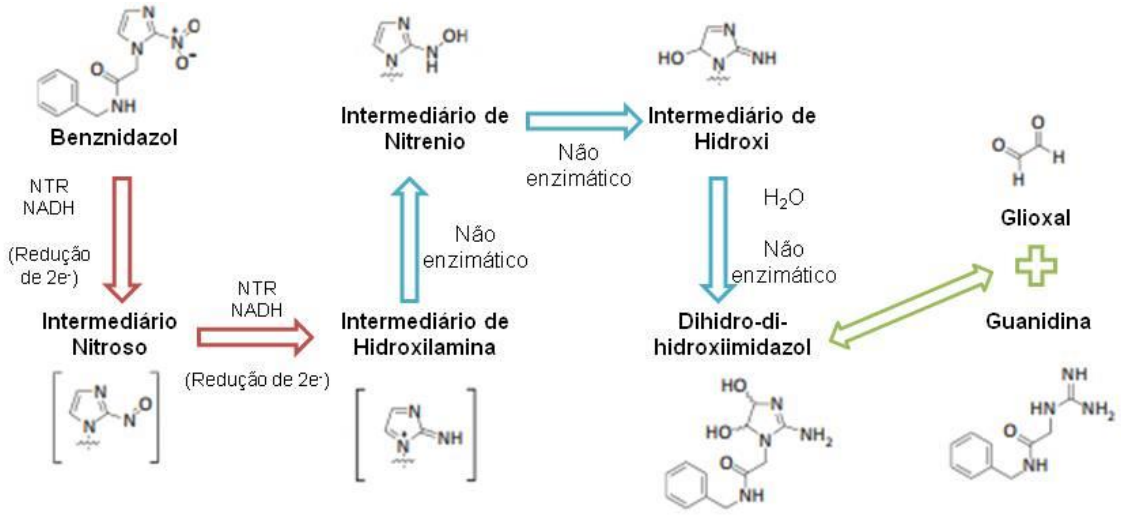


Figura 04: Mecanismo de ação proposto para BZ via ativação por NTR do tipo I. Adaptado de Patterson; Wyllie (2014).

Na ativação de nitroderivados também foram implicadas NTRs de tipo II, sensíveis ao oxigênio. Estas enzimas catalisam a redução de um elétron do grupo nitro do BZ, produzindo um ânion radical. Na presença de oxigênio, este radical sofre auto-oxidação com oxigênio molecular que parcialmente reduz e regenera o fármaco, havendo produção de ânion superóxido (O_2^-), que gera estresse oxidativo no parasito (MAYA et al. 2007; HALL; WILKINSON, 2012; BERMUDEZ et al. 2016; WILKINSON; KELLY, 2009). O O_2^- formado sofre dismutação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) produzindo O_2 e H_2O_2. Estes, na presença de íon férrico (Fe_3^+), formam o radical livre hidroxila (OH^-), o qual se liga a lipídios, proteínas e DNA, causando danos (Figura 05) (MAYA et al. 2007).

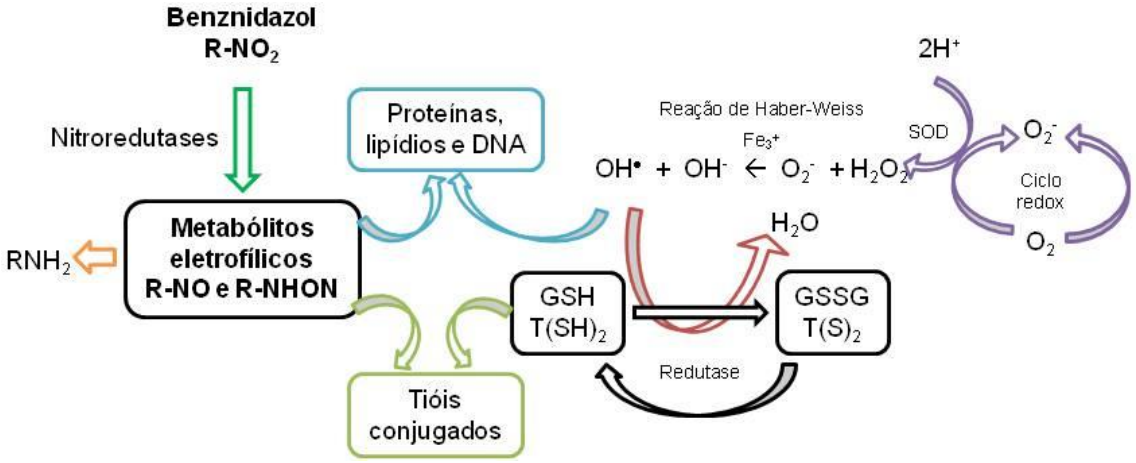


Figura 05: Mecanismo de ação proposto para BZ via ativação por NTR do tipo II. $T(SH)_2$: tripanotiona; GSH: glutationa. Adaptado de Maya et al. (2007).

Superóxido dismutases (SODs) são um grupo de metaloenzimas que possuem intensa ação antioxidante e que protegem células e diversos patógenos das espécies reativas de oxigênio. É interessante notar que tripanossomatídeos e outros parasitos protozoários contém apenas SODs ligadas a Fe, ao passo que, em mamíferos, as SODs são ligadas a cobre-zinco e manganês.

Algumas evidências apoiam a participação de Fe-SODs no mecanismo de ação de BZ. Quatro isoformas de Fe-SOD, duas encontradas tanto no citossol como no glicossoma (SODB1 e SODB2) e duas mitocondriais (SODA e SODC) foram descritas em *T. brucei* (DUFERNEZ et al. 2006; HALL; WILKINSON, 2012). *T. brucei* e *T. cruzi* com níveis geneticamente alterados de SODB1 mostraram-se mais sensíveis ao BZ do que os controles, sugerindo que perturbações desta enzima levem a um desequilíbrio do metabolismo do O_2^- (HALL; WILKINSON, 2012). Foi descrito ainda que parasitos com níveis baixos ou nulos de atividade de SODB1 são mortos por O_2^-, enquanto que parasitos com níveis elevados da enzima são afetados por H_2O_2 (HALL; WILKINSON, 2012; WILKINSON; KELLY, 2009). Temperton et al. (1998) observaram que a superexpressão do gene que codifica a SODB1 citossólica (GenBank AAB39949.1) promovia um aumento na sensibilidade ao BZ. Por outro lado, em trabalho posterior, Nogueira et al. (2006) verificaram que parasitos com resistência a BZ selecionada *in vitro* por pressão com o fármaco apresentavam superexpressão da *Tc*FeSOD-A (GenBank AAX84934.1). Os autores levantaram a possibilidade de que nestes parasitos haveria também a superexpressão de outras enzimas antioxidantes envolvidas no metabolismo de H_2O_2 e, desta forma, ocorreria a detoxificação do hidroperóxido, promovendo o fenótipo de resistência.

Parasitos selecionados para resistência a BZ *in vitro* apresentam expressões alteradas de outras enzimas, incluindo componentes do sistema de defesa oxidativo do parasito, sugerindo que um mecanismo alternativo pode ser responsável pela atividade tripanocida desta droga (HALL; WILKINSON, 2012; BERMUDEZ et al. 2016). Por exemplo, a tripanotiona ($T(SH)_2$) e a glutationa (GSH) do parasito que neutralizariam, por conjugação, os metabólitos derivados do BZ e os radicais livres (MAYA et al. 2007).

Até o momento não há dados que permitam correlacionar as falhas terapêuticas a BZ ou a NFX com a capacidade intrínseca do *T. cruzi* de adquirir resistência aos fármacos por pressão seletiva. Este conhecimento é relevante, pois tem implicações diretas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DC.

1.6 NOVOS TRATAMENTOS PARA A DOENÇA DE CHAGAS

Tendo em vista as falhas terapêuticas na fase crônica dos dois únicos fármacos disponíveis para a DC, a busca de novos compostos, de administração oral, que tenham um tratamento de mais curta duração, com menos efeitos colaterais e que sejam ativos contra todas as cepas do parasito é de elevada prioridade (OMS, 2012).

Uma série de alvos do parasito está sendo explorada para novas terapias para a DC. Dentre eles, citam-se várias classes de proteases, enzimas da via de biossíntese do ergosterol, da via glicolítica, do metabolismo dependente de grupos tióis, e DNA topoisomerases (DIAS et al. 2009).

Na busca por moléculas relevantes, um número elevado de compostos está sendo investigado por um processo de última geração chamado de triagem de alta produtividade (HTS: *high throughput screening*). Utilizando um sistema de ensaios fenotípicos em célula total (*whole-cell phenotypic assays*) a GlaxoSmithKline fez a triagem de um conjunto de 1,8 milhões de compostos contra os kinetoplastídeos patogênicos *Leishmania (L.) donovani*, *T. cruzi* e *T. brucei*. A citotoxicidade para células de mamíferos de candidatos promissores foi investigada e o putativo alvo biológico foi inferido com ferramentas de bioinformática. Atualmente, cerca de 200 compostos promissores para cada parasito estão elencados, cujos alvos seriam quinases, proteases e citocromos (PEÑA et al. 2015). O conjunto de compostos está disponível para a comunidade para o prosseguimento de estudos de descoberta de novos fármacos.

O reposicionamento de fármacos (*Drug repurposing*), originalmente licenciados para outras doenças, emerge como uma estratégia atraente para novas terapias para doenças negligenciadas. Esta estratégia apresenta a vantagem potencial de facilitar um desenvolvimento rápido e de menor custo, uma vez que os ensaios pré-clínicos e clínicos podem ser baseados em dados já disponíveis.

Para a DC alguns derivados azólicos antifúngicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, foram considerados candidatos promissores. Isto porque, *T. cruzi* como fungos dependem do ergosterol endógeno para a formação de membranas, divisão celular, e desenvolvimento. Os compostos azólicos: Posaconazol, Ravuconazol e E-1224 (pró-droga do Ravuconazol) alcançaram triagens clínicas avançadas como candidatos a fármacos anti-*T. cruzi*. O primeiro ensaio clínico, CHAGASAZOL, foi conduzido na Espanha e tinha como objetivo comparar o efeito de BZ com o do Posaconazol, administrado em duas doses por 60 dias. O resultado do ensaio mostrou a falha do Posaconazol em manter uma resposta sustentável durante o seguimento dos pacientes, ao contrário do BZ (MOLINA et al. 2014). O ensaio clínico de fase II com E-1224 também mostrou que este fármaco não foi capaz de sustentar sua eficácia um ano após o final do tratamento (DND*i*, 2017a). Outro composto considerado promissor é o Fexinidazol (1-metil-2-((p-(metiltio)-fenoxi) metil)-5-nitroimidazol), um composto nitroheterocíclico que apresenta atividade antimicrobiana. Na última década, Fexinidazol mostrou ser um excelente candidato para a cura de tripanossomíase africana humana de estágio dois. Em 2012, foi mostrada sua eficácia contra *T. cruzi* em modelo experimental (BAHIA et al. 2012).

Em 2008, a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DND*i*: *Drugs for Neglected Diseases initiative*) junto com o LAFEPE desenvolveu um programa para definir e produzir uma formulação pediátrica do BZ, permitindo que fosse investigada a farmacocinética de BZ em crianças de 2 a 12 anos portadoras da DC (ALTCHEH et al. 2014). Os dados mostraram que as concentrações plasmáticas do fármaco são bem menores do que aquelas relatadas previamente em adultos (RAAFLAUB, 1980). O estudo confirmou ainda que as crianças tiveram altos índices de cura e apresentaram poucas reações adversas (ALTCHEH et al. 2014). Tendo em vista esses resultados, prevê-se uma redução da dosagem de BZ em adultos, com a possível redução dos efeitos colaterais (DND*i*, 2017b). Em 2009, a DND*i* lançou a Plataforma de Pesquisa Clínica de Chagas (CCRP: *Chagas Clinical Research Platform*) através da qual parceiros, especialistas e partes interessadas se reúnem para apoiar a avaliação e o desenvolvimento de novos tratamentos para a DC (DND*i*, 2017c).

1.6.1 Derivados da Nifuroxazida

A Nifuroxazida (NF: 5-Nitro-2-furaldehido p-hidroxibenzoilhidrazona) (Figura 06) é um nitrofurano, utilizado como antibiótico de via oral para o tratamento de colite e diarreia em humanos e não humanos. Uma vez que uma série de compostos nitroheterocíclicos apresentam atividade anti-tripanosoma (ver acima), o laboratório do Prof. D.r Leoberto Tavares (FCF-USP) focalizou estudos no sentido de utilizar a NF como composto protótipo para a introdução de modificações químicas, visando à obtenção de compostos ativos contra *T. cruzi*. Entre os análogos obtidos, alguns mostraram atividade contra a forma epimastigota da cepa Y (DTU TcII) (PALACE-BERL et al. 2013). Subsequentemente, 21 novos análogos da NF foram sintetizados com substituições na região indicada na Figura 06 e, em colaboração com o laboratório no qual esse estudo foi realizado, foram ensaiados contra três cepas de *T. cruzi*, que representam as DTUs mais prevalentes em pacientes: TcI, TcII e TcV (PALACE-BERL et al. 2015). Todos os derivados, menos um, tiveram atividade tripanocida maior que BZ e 60% dos compostos foram mais eficazes que NFX. O composto mais promissor apresentou concentração inibitória média (CI_{50}: *half maximal inhibitory concentration*) em torno de 1 µM. Ensaios de citotoxicidade para fibroblastos humanos indicaram índices elevados de seletividade para muitos compostos (PALACE-BERL et al. 2015). Subsequentemente, a análise exploratória do conjunto de dados foi realizada, determinando o desenho e síntese de novos compostos, cuja atividade foi avaliada contra formas amastigotas intracelulares. Os compostos mais ativos apresentaram um índice de seletividade (IS) maior que 200 (IS é a razão entre a CC_{50}, concentração citotóxica para metade das células, e a IC_{50} para o parasito) e uma atividade 70 vezes maior que BZ (PALACE-BERL, 2016; PALACE-BERL et al. 2018).

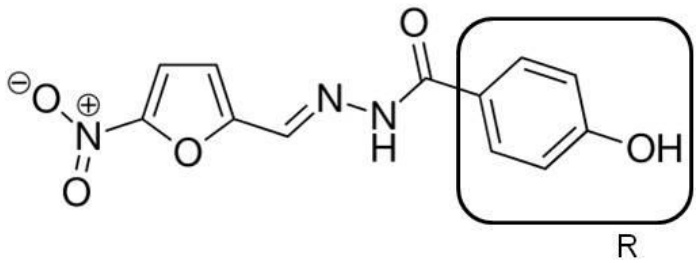


Figura 06: Estrutura da Nifuroxazida. O retângulo mostra a região onde as modificações moleculares (R) foram introduzidas. Adaptado de Palace-Berl et al. (2015).

1.6.2 Derivados da Quinazolina

O interesse nas atividades terapêuticas de compostos de quinazolina começou com a descoberta da febribugina, uma quinazolinona extraída da planta chinesa *Dichroa febrifuga* Lour, que apresentava potencial antimalárico (VIJAYCHAND et al. 2011).

A Quinazolina (Figura 07) é um composto formado pela fusão de dois anéis aromáticos de seis membros: um anel benzênico e um anel pirimidínico. Possui a fórmula molecular $C_8H_6N_2$ e uma massa molecular de 130,15 g/mol.

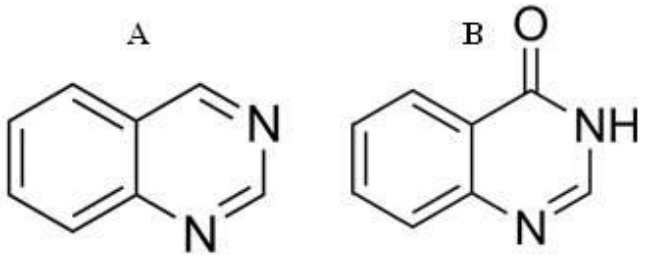


Figura 07: Fórmula estrutural da molécula de quinazolina (A) e quinozolinona (B).

Estudos da década de 50 e 60 mostraram que as quinazolinas, além da ação antimalárica, também eram eficazes contra diferentes enfermidades causadas por bactérias, protozoários e vírus (VIJAYCHAND et al. 2011).

Nos últimos 15 anos, o estudo de derivados de quinazolina revelou um amplo espectro de atividades terapêuticas incluindo efeitos analgésicos, anticâncer, anti-inflamatório, antibacteriano, antiespasmódio, antituberculostático, antimalárico, anti-hipertensivo, antiobesidade, antipsicótico e antidiabético, dentre outros (VIJAYCHAND et al. 2011). Essa gama de atividades biológicas foi possível graças à introdução de diferentes grupos ativos na molécula de quinazolina utilizando-se métodos sintéticos (WANG et al. 2013).

Nos anos 70, a ação parasiticida do derivado de quinazolina, N6-(4-metoxibenzil)quinazolina-2,4,6-triamina, foi relatada em casos de malária resistente a fármacos e na DC (DAVOLL et al. 1972). Seu alvo de ação, a inserção na monocamada externa da membrana de eritrócitos humanos infectados com plasmódio, só foi descoberto recentemente (ROJAS-AGUIRRE et al. 2012). A atividade antimalárica de derivados de pirroloquinazolinadiamina também foi reportada (GUAN et al. 2005).

Em estudo recente Mendoza-Martínez et al. (2015) desenharam e sintetizaram um conjunto de análogos de quinazolina-2,4,6-triamina (Figura 08) baseados em estudos de *docking* na enzima dihidrofolato *redutase* (DHFR) de *T. cruzi*, *Leishmania (L.) major* e

Plasmodium vivax e na pteridina *redutase* (PTR) de *T. cruzi* e *L. (L.) major*. A atividade dos compostos foi avaliada contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promatigotas de *L. (L.) mexicana.* Vários compostos mostraram atividade parasiticida maior que o de fármacos utilizados no tratamento das infecções provocadas pelos protozoários.

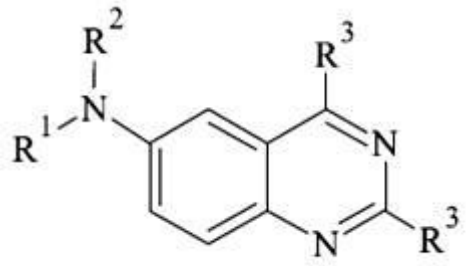


Figura 08: Esquema da posição de substituintes nos derivados de quinazolina-2,4,6-triamina (MENDOZA-MARTÍNEZ et al. 2015).

A quinozolinona é um derivado da quinazolina (Figura 07). Vários derivados de quinazolinona também possuem um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, tais como ação antimicrobiana, broncodilatadora, antagonista do receptor de anti-histamínico, anti-inflamatória e anti-herpes (KIRUTHIGA et al. 2009). Derivados de quinazolinona mostraram ser inibidores não competitivos da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de *T. cruzi* e compostos protótipo para novos tratamentos da DC (MERCALDI et al. 2014). A G6PDH catalisa o primeiro passo da via das pentoses, que provê à célula NAD(P)H, coenzima essencial para vias biossintéticas e para enzimas que atuam em processos antioxidantes.

1.6.3 Derivados de Oxadiazol

O Oxadiazol é um composto aromático heterocíclico de fórmula molecular $C_2H_2N_2O$. Há quatro isômeros de oxadiazol (Figura 09).

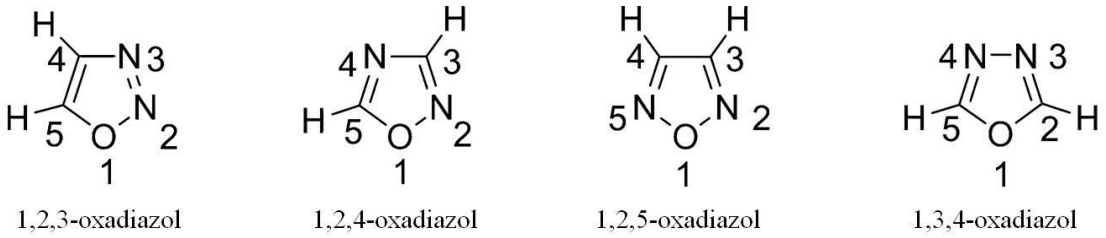


Figura 09: Isômeros de Oxadiazol. Adaptado de Regueira; de Freitas; Freitas Filho (2016).

Oxadiazóis são elementos recorrentes em moléculas de uso terapêutico. Seus derivados apresentam atividades anti-inflamatórias, anti-HIV, anticâncer e antimalárica (SAHU, 2011).

Alguns derivados de 1,2,5 e 1,3,4-oxadiazois exibem citotoxicidade para *T. cruzi*, possivelmente por serem inibidores da enzima cruzaína (ISHII et al. 2011; SANTOS FILHO et al. 2009). Mais recentemente, um derivado de 1,2,4-oxadiazol foi eficaz na eliminação da infecção em camundongos (SANTOS FILHO et al. 2012).

1.7 QUIMIOTERAPIA PARA OUTROS PARASITOS DA FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE E SENSIBILIDADE A BENZNIDAZOL

Como visto na Tabela 01, na família Trypanosomatidae estão incluídos dois gêneros - *Leishmania* e *Trypanosoma* - que podem ser infectantes para mamíferos. No gênero *Trypanosoma*, três espécies são naturalmente infectantes para o homem: *T. cruzi*, *T. brucei* (destacando-se as subespécies - *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*), e *T. rangeli*. Porém somente as duas primeiras espécies, *T. cruzi* e *T. brucei*, são patogênicas para o homem, sendo os agentes etiológicos da DC e da doença do sono, respectivamente. *T. rangeli* não é considerado patogênico para o homem, apesar de ser importante em estudos epidemiológicos, já que esse organismo é encontrado nos mesmos vetores e reservatórios do *T. cruzi* em alguns países da América do Sul. Tendo em vista que os dois tripanossomos possuem antígenos em comum, a depender da natureza do antígeno utilizado em diagnósticos sorológicos pode haver reação cruzada (PAVIA et al. 2007). A leishmaniose é uma antropozoonose causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Nas Américas, onze espécies deste gênero infectam os humanos e oito infectam apenas animais (REIS et al. 2013).

Alguns medicamentos estão disponíveis para o tratamento das leishmanioses, mas muitos deles apresentam limitações, tais como, elevada toxicidade, via de administração parenteral e alto custo. Antimoniais pentavalentes foram a primeira classe de fármacos empregados no tratamento dessas parasitoses. Todavia, houve um aumento nas falhas

terapêuticas, principalmente em função do surgimento de resistência, o que induziu a OMS a recomendar a anfotericina B lipossomal como primeiro fármaco para o tratamento na maioria das áreas. Devido às dificuldades de acesso à anfotericina B lipossomal, principalmente quanto ao preço, os antimoniais pentavalentes continuam sendo amplamente utilizados no tratamento da leishmaniose visceral (LV). Contudo, na Índia, tem sido utilizada a miltefosina para tratar a LV, sendo muito eficaz contra *L. (L.) donovani*. Os antimoniais pentavalentes ainda são o tratamento de primeira escolha para a leishmaniose cutânea (LC) em grande parte dos países onde é endêmica, ao passo que a anfotericina B é reservada para casos onde houve falha terapêutica (ULIANA et al. 2017).

Outro medicamento que tem se mostrado efetivo contra a leishmaniose visceral é a paromomicina (também chamada aminosidina). Estudos clínicos, para investigar a eficácia da paromomicina injetável contra LV, têm sido realizados na Índia, onde o tratamento antimonial padrão não é muito efetivo e as taxas de mortalidade são altas.

Com isso, a miltefosina é a única alternativa oral em uso para o tratamento das leishmanioses, tendo sido incorporada ao arsenal quimioterápico na Índia em 2002 para o tratamento de LV (JHA et al. 1999; SUNDAR et al. 2002; CROFT; COOMBS, et al. 2003; DORLO et al. 2012) e posteriormente, em 2004, na Colômbia para o tratamento da leishmaniose tegumentar (SOTO et al. 2004). No Brasil, dois ensaios clínicos (MACHADO et al. 2010; CHRUSCIAK-TALHARI et al. 2011) foram realizados utilizando a miltefosina para o tratamento da leishmaniose cutânea e, apesar de indicarem uma eficácia superior aos antimoniais, o fármaco ainda não foi aprovado para uso no país.

Relatos escassos descrevem estudos da atividade de nitroheterocíclicos no tratamento de leishmanioses. Um ensaio clínico com 26 pacientes com leishmaniose mucocutânea descreve baixos índices de cura com NFX (MARSDEN et al. 1979). Em estudos *in vitro* foi avaliada a atividade de NFX e BZ sobre formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*. Após cinco dias de incubação com 27 mg/L (97 μM) de cada fármaco, a inibição do crescimento dos parasitos com NFX foi de 81%, ao passo que a inibição com BZ foi de apenas 36% (NEAL; CROFT, 1984). Tendo em vista que uma NTR de tipo I (*Lm*NTR), homóloga à *Tc*NTR de *T. cruzi*, foi descrita em *L. (L.) major*, e que esta enzima é capaz de ativar *in vitro* BZ e NFX (VOAK et al. 2013), é intrigante a atividade parasiticida diferencial dos dois compostos.

A tripanossomíase africana humana (HAT: *Human African Trypanosomiasis*), comumente conhecida como doença do sono, pode ser causada por dois agentes etiológicos

diferentes, como citado acima. O tratamento para a infecção por estes tripanossomatídeos é distinto para cada subespécie. Sendo que a pentamidina tem sido utilizada no tratamento do primeiro estágio da infecção por *T. b. gambiense* e a monoterapia com eflornitina em dosagem elevada ou a combinação de NFX e eflornitina no tratamento da fase crônica (KEATING et al. 2015; WILKINSON; KELLY, 2009). NFX foi eficaz nos estágios agudos e crônicos da infecção causada por *T. b. gambiense*, sendo que ensaios clínicos mostraram taxas de cura de 30 a 80% (BOUTEILLE et al. 2003) e efeitos tóxicos em doses elevadas do fármaco e em tratamento prolongado (PÉPIN et al. 1992). Consequentemente, NFX não foi aprovado como monoterapia, mas sim em terapia combinada com eflornitina (PRIOTTO et al. 2009). Para tratar *T. b. rhodesiense*, a suramina é utilizada na fase aguda; na fase crônica, o paciente é tratado com melarsoprol, o qual é altamente tóxico (KEATING et al. 2015).

Uma pró-droga de diamina, DB289, foi testada *in vitro* e em modelos animais, e, por não ter sido detectada toxicidade nestes modelos, o composto foi testado em pacientes infectados com *T. b. gambiense.* Estes apresentaram 95% de cura na fase aguda. No entanto, foi identificada toxicidade aguda nos rins, sendo então suspenso seu desenvolvimento clínico. O nitroimidazol Fexinidazol foi bem avaliado em ensaios clínicos de fase I e ensaios de fase II/III iniciaram em 2012. Espera-se que os resultados sejam divulgados em 2017/2018 (JONES; AVERY, 2015).

Apenas dois relatos descrevem a atividade de BZ sobre formas sanguíneas de *T. brucei* (PRATHALINGHAM et al. 2007; WILKINSON et al. 2008). Os estudos mostram que a deleção do gene da superóxido dismutase glicossomal (*Tb*SODB1) aumenta a sensibilidade dos parasitos a BZ e NFX, evidenciando a associação entre a atividade tripanocida e a indução de radicais livres por parte dos compostos (PRATHALINGHAM et al. 2007). Por outro lado, a superexpressão do gene da nitroredutase mitocondrial (*Tb*NTR) confere hipersensibilidade a ambos os fármacos, indicando um mecanismo de ativação dos mesmos semelhante àquele proposto para *T. cruzi* (WILKINSON et al. 2008).

O efeito de NFX foi avaliado na infecção murina com *T. rangeli*, mostrando que o composto é eficaz na negativação da parasitemia, como observado na infecção por *T. cruzi* (MARINKELLE, 1982). O efeito de BZ não foi investigado nesse organismo.

T. lewisi é um parasito cosmopolita de ratos, transmitido por pulgas. Infecções humanas por *T. lewisi* foram descritas na Ásia. Na busca de medicamentos para o tratamento desta infecção, vários compostos eficazes contra tripanossomíases humanas foram ensaiados em modelos experimentais em ratos. Conclui-se que o isolado de *T. lewisi* (R6465), obtido de

um rato silvestre na Tailândia, apresentou resistência a suramina, pentamidina, eflornitina, NFX, BZ e fexinidazol (DESQUESNES et al. 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Conforme comentado anteriormente, os únicos dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: BZ e NFX, embora bastante eficazes no tratamento de Chagas agudo e de recém-nascidos com Chagas congênito, apresentam falhas terapêuticas na fase crônica da doença e efeitos secundários que, em alguns casos, determinam a suspensão do tratamento.

As razões para as falhas terapêuticas não são conhecidas, mas têm sido atribuídas a diferenças de sensibilidade das cepas do parasito aos fármacos, a características genético-imunológicas dos pacientes, e à resultante da interação entre os dois fatores. Vários estudos em modelos experimentais comprovam as diferenças de sensibilidade a BZ e NFX em cepas do *T. cruzi* e mostram a existência de cepas resistentes a ambos (FILARDI; BRENER, 1987).

Desta forma, fica evidente que é prioritária a busca de novos compostos para o tratamento da doença de Chagas, que sejam eficazes contra todas as cepas do parasito, que atuem nas fases aguda e crônica da doença e que não apresentem efeitos colaterais indesejáveis. Por outro lado, tendo em vista que o desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e dispendioso, é também relevante entender os fatores que determinam a resistência inata das cepas do *T. cruzi* aos fármacos disponíveis.

Nesse estudo, procurou-se abordar os dois temas em dois subprojetos. No primeiro, foi avaliada a atividade anti-*T. cruzi* de derivados da quinazolina e do oxadiazol, sintetizados pelo grupo da Prof.a D.ra Iolanda M. Cuccovia (Laboratório de Sistemas Biomiméticos, IQ-USP). Esses compostos apresentaram boa atividade bactericida (dados não publicados), e, além disto, uma revisão da literatura indicou que derivados da quinazolina-2,4,6-triamina apresentaram atividade parasiticida contra *T. cruzi*, *L. (L.) major* e *P. vivax* (MENDOZA-MARTÍNEZ et al. 2015) e que um derivado de 1,2,4-oxadiazol foi eficaz na eliminação da infecção por *T. cruzi* em modelo murino (SANTOS FILHO et al. 2012). Essas evidências justificaram a avaliação da atividade anti-*T. cruzi* dos novos compostos sintetizados pelo grupo da D.ra Cuccovia.

No segundo subprojeto, buscou-se abordar o tema da resistência natural (inata) de cepas de *T. cruzi* a BZ, fármaco de primeira escolha no tratamento da doença de Chagas, de forma indireta, ou seja, extendendo o estudo da resistência natural a vários tripanossomatídeos. Conforme relatado acima, poucos estudos descrevem a atividade de BZ em tripanossomatídeos. Para formas sanguíneas de *T. brucei* foi descrita uma CI_{50} de 13 µM para BZ (PRATHALINGHAM et al. 2007). Por outro lado, uma alta concentração de BZ (97

μM) teve um efeito inibitório mínimo na proliferação de formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani* (NEAL; CROFT, 1984). Para *T. rangeli* não foi investigada a ação de BZ, ao contrário dos relatos que mostram que NFX é eficaz na negativação da parasitemia na infecção murina por esse organismo (MARINKELLE, 1982). Alguns relatos em tripanossomas de morcego do subgênero *Schizotrypanum* indicam que BZ, em concentrações bastante elevadas, inibem o crescimento de formas epimastigotas (BAKER; SELDEN, 1981; CERIDÓREO CORRÊA et al. 2011). Isto também foi verificado para *Crithidia fasciculata*, que é, em contrapartida, é muito sensível a baixas concentrações de NFX (GUTTERIDGE et al. 1982).

O conjunto de observações nos estimulou a estudar a sensibilidade a BZ em alguns tripanossomatídeos.

Nesta Dissertação, os dois subprojetos serão tratados de forma independente e discutidos conjuntamente no final.

3 SUBPROJETO 1: ATIVIDADE ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA E DE OXADIAZOL

3.1 OBJETIVOS

O objetivo geral desse subprojeto foi avaliar a atividade anti-*T. cruzi* de alguns derivados da quinazolina e do oxadiazol.

Objetivos específicos:

a) Determinar a atividade contra formas epimastigotas das cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana;
b) Determinar a citotoxicidade para células de mamífero em cultura de compostos que apresentam atividade anti-*T. cruzi*;
c) Analisar o coeficiente de partição octanol/água dos derivados de quinazolina e oxadiazol, visando estabelecer uma possível correlação entre o grau de hidrofobicidade/hidrofilicidade e a atividade parasiticida.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Compostos

Os compostos foram sintetizados no Laboratório de Sistemas Biomiméticos da Prof.a D.ra Iolanda M. Cuccovia (IQ-USP), pelo D.r Sanapalli Nagi Reddy. Nove compostos foram avaliados em nosso estudo: cinco derivados de 6,7-dimetoxiquinazolina (derivados de quinazolina - série SNR-02, Figura 10) e quatro derivados de 1,3,4-oxadiazol (derivados de oxadiazol - série SNR-03, Figura 11).

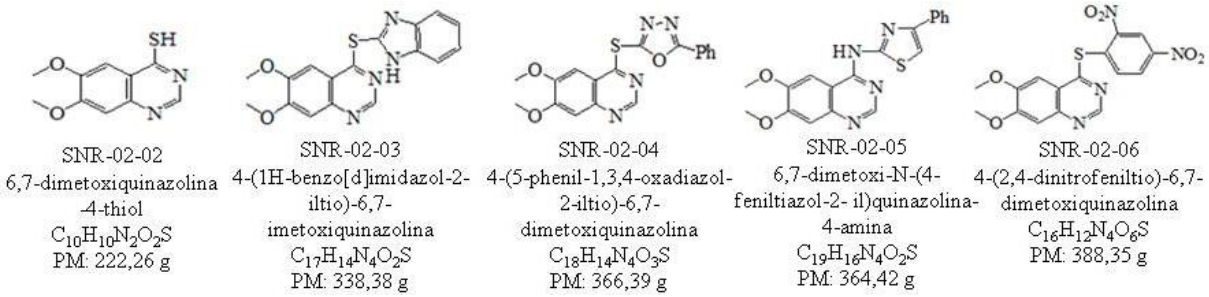


Figura 10: Características dos compostos derivados da quinazolina. PM: peso molecular.

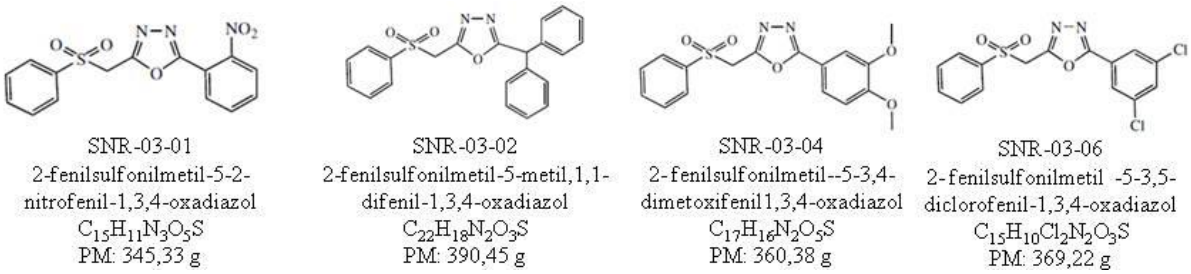


Figura 11: Características dos compostos derivados de oxadiazol. PM: peso molecular.

3.2.2 Soluções estoque dos compostos

Dimetilsulfóxido (DMSO) é considerado um bom veículo para fármacos para ensaios *in vivo* e *in vitro* por apresentar propriedades de permeação, difusão e ação carreadora adequadas para facilitar o acesso dos compostos às células (LEEKUMJORN; SUM, 2006). Soluções estoque dos derivados de quinazolina e oxadiazol foram preparadas em 100% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na concentração de 4 mM ou 8 mM, de acordo com sua solubilidade. Como controle, foi preparada uma solução estoque de NFX (Bayer) na

concentração de 50 mM em 100% DMSO. As soluções foram armazenadas a -70 °C e os compostos armazenados a -20 °C, protegidos da luz.

3.2.3 Cepas de T. cruzi

Os estudos foram conduzidos com formas epimastigotas de cepas isoladas de pacientes: Silvio X10.cl1 e Colombiana, ambas pertencem à DTU TcI (ZINGALES et al. 2009). Em modelo murino, a cepa Silvio X10.cl1 foi considerada sensível e a cepa Colombiana, resistente a BZ e NFX (FILARDI; BRENER, 1987). Os parasitos foram cultivados em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose)* suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As culturas foram mantidas a 28 °C em estufa (BOD, *Biochemical Oxygen Demand*) e repicadas em fase exponencial de crescimento, sem haver a formação de rosetas. Duas formulações de meio LIT foram utilizadas, uma suplementada com Hemina (25 mg/L) (LIT-He) e outra, com Hemoglobina (6 a 8%) (LIT-Hb) *(*APÊNDICE A).

3.2.4 Ensaio para a determinação da atividade anti-T. cruzi

A atividade dos compostos foi avaliada usando-se a metodologia descrita por Cerecetto et al. (1999), com algumas modificações. Nesta abordagem, o crescimento dos parasitos é monitorado pela medida da absorbância do meio de cultura (ver Resultados). Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades de fundo plano, numa densidade final de 10^7 parasitos/mL e expostas aos compostos, nas concentrações indicadas em Resultados, por 72h a 28 °C. Dois controles foram utilizados: um Controle positivo (C+), em que os parasitos foram incubados em ausência de compostos e, um Controle negativo (C-), em que os parasitos foram incubados com o fármaco de referência NFX. O ensaio (volume final de 200 µL) foi realizado em triplicatas, em meio LIT - 10% SFB, contendo DMSO na concentração final de 1%, esta concentração não afeta o crescimento dos parasitos. Imediatamente após o preparo da microplaca com os parasitos e os compostos, foi determinada a absorbância de cada cavidade (tempo zero) em leitor de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Epoch da BioTek Instruments). Após incubação por 72h a 28 °C, as amostras foram homogeneizadas em agitador de microplaca (Unimixer – Uniscience, São Paulo, Brasil) e nova leitura da absorbância foi realizada. Os valores obtidos foram convertidos em concentração de parasitos (ver Resultados), calculando-se a porcentagem de inibição do crescimento (%IC) em relação

ao controle sem composto (C+). Também foi calculado o tempo de geração (TG) da cultura, a partir da concentração de parasitos na fase exponencial de crescimento. O esquema do ensaio é ilustrado na Figura 12. Para validar o método, também foi feita a contagem em câmara de Neubauer, dados não mostrados.

Para compostos promissores, a atividade anti-*T. cruzi* foi avaliada variando-se a concentração dos mesmos. A partir dos dados obtidos foi determinada a CI_{50}, que corresponde à concentração do composto que inibe 50% do crescimento da cultura. O valor da CI_{50} foi calculado com o programa *OriginPro8.0* (versão 8.0. SR00 - Trial, OriginLab Corporation: Northampton, MA, EUA, 2007, licença institucional).

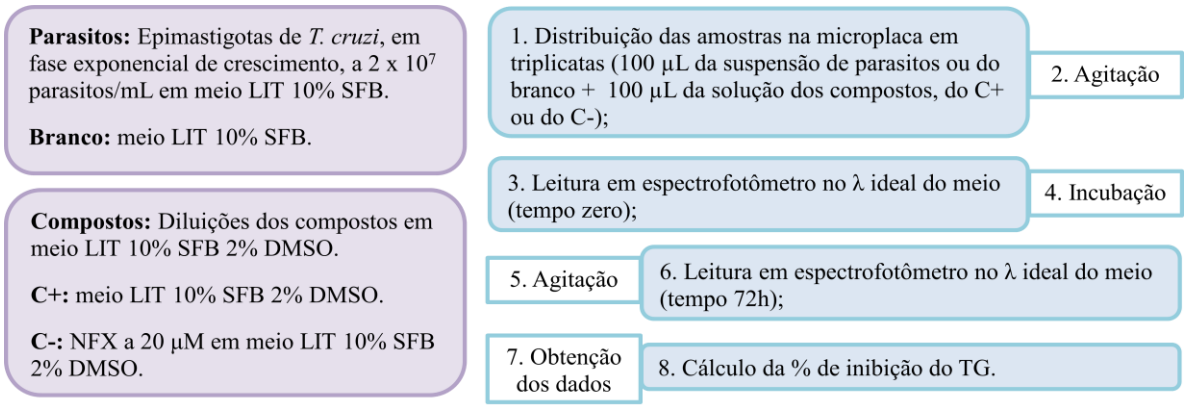


Figura 12: Esquema do ensaio para determinar a atividade anti-*T. cruzi* dos compostos.

3.2.5 Ensaio para determinar a citotoxicidade para células de mamífero em cultura

A citotoxicidade do composto para células LLC-MK2 (células epiteliais renais de macaco *Rhesus*) foi determinada com base na redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a um composto colorido, denominado formazan (Figura 13) (MOSMANN, 1983). Este ensaio possibilita avaliar a viabilidade celular, dado que o anel de tetrazólio do MTT é clivado por desidrogenases celulares, as quais estão presentes apenas em células metabolicamente viáveis. O produto desta reação é o formazan, que é insolúvel em soluções aquosas. Para evidenciá-lo deve ser solubilizado em DMSO.

Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio]
(MTT)

Formazan

Amarelo **Púrpura**

Figura 13: Desenho esquemático da conversão do MTT em formazan. Neste ensaio desidrogenases celulares clivam o anel de tetrazólio do MTT transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração púrpura, chamado de formazan.

Procedimento: Monocamadas de células LLC-MK2 foram cultivadas em microplacas de 96 cavidades, de fundo plano, em meio RPMI 1640 sem fenol (Gibco™), suplementado com 10% SFB. Após incubação inicial para propiciar que as células ficassem confluentes, essas células foram expostas a diferentes concentrações de composto, em presença de uma concentração fixa de 0,5% DMSO, por 72h, a 37 °C em atmosfera de 5% CO_2. O controle positivo (C+) foi incubado em ausência de composto e o controle negativo (C-) em presença de azida sódica 0,3 µM. Após incubação, a microplaca foi centrifugada a 1200 xg por 10min a 20 °C e foram retirados 150 µL do sobrenadante. A monocamada foi lavada com 100 µL de RPMI 1640 10% SFB, novamente centrifugada, e o sobrenadante retirado. Em seguida, foram adicionados 150 µL de MTT (1 mg/mL em PBS, pH 7,4) procedendo-se a uma incubação de 2h30min a 37 °C em atmosfera de 5% CO_2. Após este período, a microplaca foi centrifugada a 1200 xg por 10min a 20 °C. Foram retirados 150 µL do sobrenadante e o formazan produzido foi solubilizado com 150 µL de DMSO pré-aquecido em banho a 56 °C. A microplaca foi homogeneizada por 30min à temperatura ambiente por agitação no escuro. A coleta de dados foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 590 nm.

3.2.6 Modelos moleculares tridimensionais dos derivados de quinazolina e oxadiazol e determinação do coeficiente de partição

Os modelos moleculares tridimensionais (3D) dos compostos foram construídos, inicialmente, no programa *Hyperchem 8.0* (HYPERCUBE, 2016). Com o mesmo programa

realizou-se a otimização da geometria dos compostos em método de campo de força empírico MM+ (derivado do MM2) (ALLINGER, 1977), aplicando-se o método Polak-Ribière (gradiente RMS 0,1 kcal/Å mol, POLAK, RIBIÈRE, 1969). Em seguida, calcularam-se as cargas atômicas parciais de ponto único com o método de mecânica quântica semi-empiríco Hamiltoniano AM1 (AustimModel 1) (DEWAR et al. 1985). No programa *Marvin Beans versão 16.2.29.0* (CHEMAXON, 2016) foi calculado o CLogP, obtido pelo método de pesos do programa, o qual atribui pesos iguais para os métodos de Viswanadhan et al. (1989) e Klopman et al. (1994).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Determinação da atividade anti-T. cruzi de compostos derivados da quinazolina e do oxadiazol

3.3.1.1 Determinação do comprimento de onda ideal do meio de cultura para monitorar a atividade dos compostos

Na literatura não foram encontrados relatos do efeito da composição do meio de cultura sobre a atividade de compostos anti-*T. cruzi*. Desta forma, decidiu-se abordar esse aspecto utilizando duas formulações do meio LIT (APÊNDICE A). O meio LIT-He é usado rotineiramente no laboratório aonde este estudo foi desenvolvido; o meio LIT-Hb, no laboratório da Prof.a D.ra Maria Júlia Manso Alves (IQ-USP). Os meios apresentam diferenças nas concentrações de nutrientes (triptose e glicose) e de sais. Além disto, um meio é suplementado com hemina (25 mg/L) (LIT-He) e outro, com hemoglobina (6 a 8%) (LIT-Hb). O heme é um fator essencial para a maior parte das células, uma vez que é indispensável para a biogênese de citocromos e de enzimas que desempenham papeis biológicos importantes. O gênero *Trypanosoma* é deficiente na via de biossíntese do heme (CENCI et al. 2016), razão pela qual o composto deve ser suplementado no meio de cultura. Nas duas formulações de meio LIT que foram utilizadas, o heme foi suplementado na forma de hemina (LIT-He) ou de hemoglobina (LIT-Hb).

Para avaliar a atividade anti-*T. cruzi*, foi utilizado o ensaio proposto por Cerecetto et al. (1999), que se baseia na variação da turbidez da suspensão parasitária submetida a diferentes concentrações de compostos. Nesta abordagem é necessário determinar o comprimento de onda do meio de cultura em que a porcentagem de sua transmitância mais se aproxima de 50% (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1998). O valor da transmitância é calculado de acordo com a Equação 1.

$$\%\mathrm{T} = 10^{(2-\mathrm{A})} \qquad (1)$$

Onde: A = absorbância e %T = porcentagem de transmitância.

Alíquotas de 200 µL de cada meio foram distribuídas nos poços de uma microplaca de fundo plano, em triplicatas. A absorbância de cada amostra foi determinada em diferentes comprimentos de onda em uma leitora de microplacas (EZ Read 400 Research – Vis, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) (Tabela 03). Com base nos valores da porcentagem de

transmitância, concluiu-se que para os meios LIT-He e LIT-Hb, os comprimentos de onda ideais são, respectivamente, 492 nm e 562 nm.

Tabela 03: Valores de absorbância e de transmitância dos meios LIT-He e LIT-Hb[a].

λ (nm)	Absorbância		% de Transmitância	
	LIT-He	LIT-Hb	LIT-He	LIT-Hb
405	1,225	3,912	5,96	0,01
450	0,396	0,641	40,18	22,85
492	0,242	0,439	57,28	36,37
562	0,173	0,284	67,14	51,95
570	0,165	0,276	68,39	52,97
580	0,146	0,261	71,45	54,84
595	0,145	0,214	71,61	61,05
620	0,120	0,185	75,86	65,27

[a] Os valores marcados com azul e em laranja realçam, respectivamente, os comprimentos de onda em que o meio LIT-He e meio LIT-Hb apresentam cerca de 50% de transmitância. Os valores representam a média de triplicatas.

3.3.1.2 Relação entre a concentração de parasitos e absorbância do meio de cultura

Para as cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana foi determinada a relação entre a concentração de parasitos e a absorbância nos meios de cultura LIT-He e LIT-Hb. Para isto, foram preparadas suspensões de parasitos, cuja concentração foi aferida por contagem em câmara de Neubauer. Os valores da absorbância, no comprimento de onda ideal de cada meio, foram determinados (Figuras 14 e 15). Nas Figuras apresentam-se também os valores das equações de regressão linear, que permitem calcular a concentração de parasitos a partir do valor da absorbância.

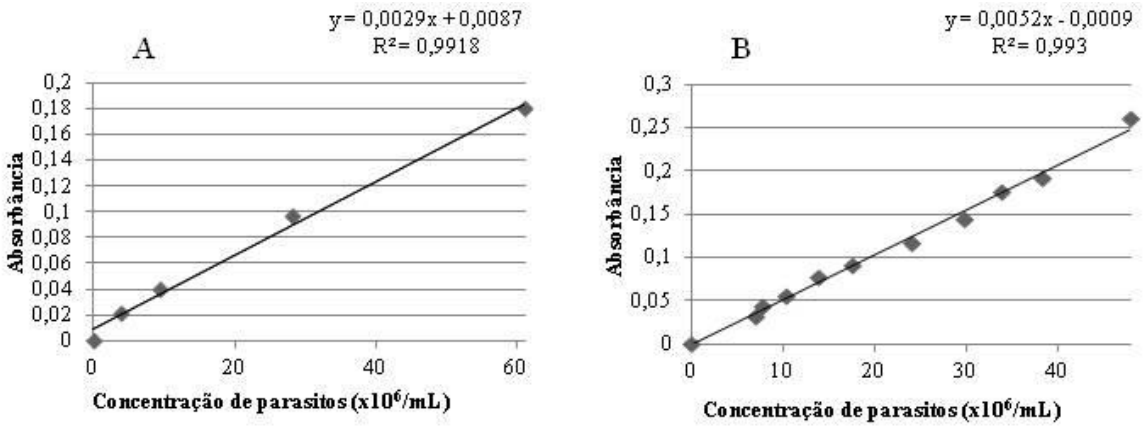


Figura 14: Relação entre a concentração de parasitos da cepa Silvio X10.cl1 e sua absorbância em meio LIT. (A) LIT-He e (B) LIT-Hb.

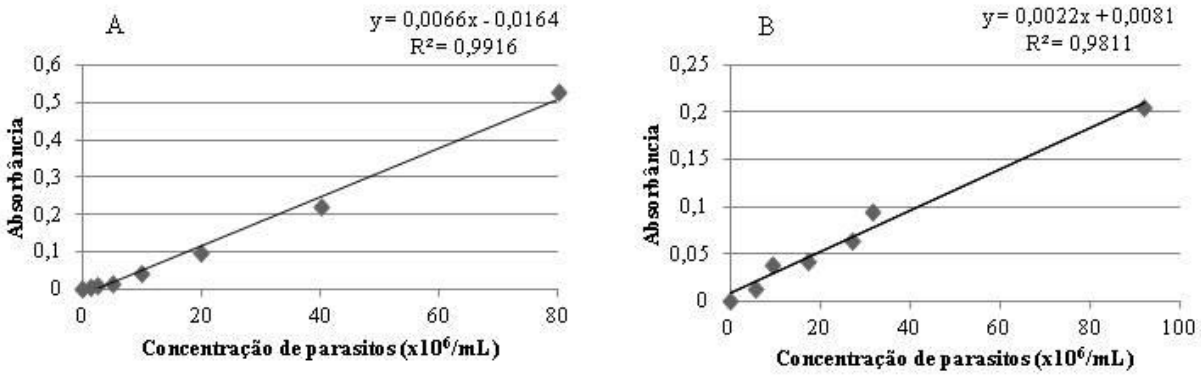


Figura 15: Relação entre a concentração de parasitos da cepa Colombiana e sua absorbância em meio LIT. (A) LIT-He e (B) LIT-Hb.

Os dados mostram que, no mesmo meio, as culturas das cepas apresentam valores de absorbância diferentes. Utilizando as equações da reta (Figuras 14 e 15), pode-se estimar que, no meio LIT-Hb uma densidade de 2 x 10^7 parasitos/mL da cepa Silvio X10.cl1 apresenta absorbância de 0,103, enquanto, para a mesma concentração de parasitos da cepa Colombiana, a absorbância é de 0,052. Curiosamente, em LIT-He os valores se invertem, sendo que na mesma densidade de parasitos, a cultura da cepa Silvio X10.cl1 apresenta absorbância de 0,067 e a da cepa Colombiana, 0,115.

Apesar de não ter sido possível explicar essas observações, é possível fazer a suposição de que as diferenças derivam de variações morfológicas e/ou metabólicas das cepas nos dois meios de cultura.

3.3.1.3 Atividade dos derivados de quinazolina e de oxadiazol contra formas epimastigotas

Inicialmente, foi avaliada a atividade dos compostos derivados de quinazolina (série SNR-02) (Figura 10) e de oxadiazol (série SNR-03) (Figura 11) contra formas epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1, na concentração final única de 10 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata, como descrito em Materiais e Métodos, com parasitos cultivados em meio LIT-He ou LIT-Hb. Como controles, os parasitos foram incubados na ausência de compostos (C+) ou em presença de 10 µM NFX (C-). Nas Tabelas 04 e 05 registram-se os valores da média e desvio padrão da absorbância das culturas após 72h de incubação a 28 °C. A concentração dos parasitos foi determinada a partir da média da absorbância das culturas utilizando-se as equações determinadas na Figura 14. A porcentagem de inibição do crescimento (%IC) foi calculada em relação ao controle sem composto (C+) convertido em número de parasitos.

Tabela 04: Efeito de derivados de Quinazolina sobre epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1 incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.

				Derivados de Quinazolina[a]			
		C+	**NFX[a]**	**SNR-02-02**	**SNR-02-03**	**SNR-02-04**	**SNR-02-06**
LIT-He	Abs. a 492 nm	0,36	0,19	0,35	0,24	0,34	0,31
	dp[b]	0,006	0,006	0,010	0,006	0,006	0
	Nº de parasitos[c]	121,1	62,5	117,7	79,8	114,2	103,9
	%IC [d]	0	48,39	2,81	34,10	5,70	14,20
LIT-Hb	Abs. a 562 nm	0,16	0,09	0,16	0,09	0,16	0,16
	dp[b]	0,006	0,006	0	0,006	0,006	0,006
	Nº de parasitos[c]	30,9	17,5	30,9	17,5	30,9	30,9
	%IC[d]	0	43,37	0	43,37	0	0

[a] Concentração final dos compostos, 10 µM;
[b] dp, desvio padrão;
[c] Concentração de parasitos x 10^6/mL;
[d] Porcentagem de inibição em relação ao controle (C+).

Tabela 05: Efeito de derivados de Oxadiazol sobre epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1 incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.

				Derivados de Oxadiazol[a]			
		C+	**NFX[a]**	**SNR-03-01**	**SNR-03-02**	**SNR-03-04**	**SNR-03-06**
LIT-He	Abs. a 492 nm	0,36	0,19	0,34	0,35	0,33	0,33
	dp[b]	0,006	0,006	0,010	0,006	0,021	0,017
	Nº de parasitos[c]	121,1	62,5	114,2	117,7	110,8	110,8
	%IC [d]	0	48,39	5,70	2,81	8,51	8,51
LIT-Hb	Abs. a 562 nm	0,16	0,09	0,15	0,15	0,15	0,15
	dp[b]	0,006	0,006	0,015	0,006	0,010	0,006
	Nº de parasitos[c]	30,9	17,5	29,0	29,0	29,0	29,0
	%IC[d]	0	43,37	6,15	6,15	6,15	6,15

[a] Concentração final dos compostos, 10 µM;
[b] dp, desvio padrão;
[c] Concentração de parasitos x 10^6/mL;
[d] Porcentagem de inibição em relação ao controle (C+).

A análise comparativa dos dados obtidos nos dois meios de cultura mostra que no meio LIT-He os parasitos controle (C+), após 72h de incubação a 28 °C, atingem uma densidade de 121,1 x 10^6 parasitos/mL, ao passo que no meio LIT-Hb a densidade da cultura controle é 30,9 x 10^6 parasitos/mL (ver abaixo o cálculo do tempo de geração das culturas). O fármaco de referência NFX promove taxas da inibição do crescimento semelhantes nos dois meios: 48,39% e 43,37%, respectivamente, nos meios LIT-He e LIT-Hb.

Para os derivados de Quinazolina, nos dois meios de cultura, SNR-02-03 foi o composto mais ativo, com inibição de 34,1% (LIT-He) e 43,4% (LIT-Hb). O composto SNR-02-06 apresentou inibição apenas no meio LIT-He (14,2%). Os demais derivados de Quinazolina e os quatro derivados de Oxadiazol, na concentração de 10 µM, não apresentaram níveis de inibição significativos em nenhum dos meios. A repetição do ensaio em ocasião diferente confirmou as conclusões acima.

Tendo em vista as diferenças de sensibilidade a fármacos em cepas de *T. cruzi*, a atividade dos compostos foi avaliada frente a formas epimastigotas da cepa Colombiana, que, em modelo murino, apresenta maior resistência a BZ e NFX do que a cepa Silvio X10.cl1 (FILARDI; BRENER, 1987). Para esta cepa, a atividade dos compostos também foi avaliada em ambos os meios de cultura (Tabelas 06 e 07).

Tabela 06: Efeito de derivados de Quinazolina sobre epimastigotas da cepa Colombiana incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.

				Derivados de Quinazolina[a]			
		C+	**NFX[a]**	**SNR-02-02**	**SNR-02-03**	**SNR-02-04**	**SNR-02-06**
LIT-He	Abs. a 492 nm	0,38	0,25	0,38	0,25	0,35	0,34
	dp[b]	0,006	0,006	0,010	0,006	0,010	0
	Nº de parasitos[c]	72,6	48,8	72,9	48,8	67,2	65,3
	%IC [d]	0	32,72	0,40	32,72	7,43	10,07
LIT-Hb	Abs. a 562 nm	0,08	0,05	0,08	0,04	0,07	0,08
	dp[b]	0,006	0,006	0,006	0	0,006	0,006
	Nº de parasitos[c]	39,0	16,8	32,7	14,5	25,6	30,2
	%IC[d]	0	56,92	16,15	62,82	34,35	22,56

[a] Concentração final dos compostos, 10 µM;
[b] dp, desvio padrão;
[c] Concentração de parasitos x 10^6/mL;
[d] Porcentagem de inibição em relação ao controle (C+).

Tabela 07: Efeito de derivados de Oxadiazol sobre epimastigotas da cepa Colombiana incubadas em meio LIT-He e LIT-Hb.

				Derivados de Oxadiazol[a]			
		C+	**NFX[a]**	**SNR-03-01**	**SNR-03-02**	**SNR-03-04**	**SNR-03-06**
LIT-He	Abs. a 492 nm	0,38	0,25	0,38	0,37	0,37	0,37
	dp[b]	0,006	0,006	0,012	0	0,010	0,006
	Nº de parasitos[c]	72,6	48,8	73,9	70,0	71,8	70,8
	%IC [d]	0	32,72	1,85	3,58	1,06	2,52
LIT-Hb	Abs. a 562 nm	0,08	0,05	0,08	0,08	0,08	0,07
	dp[b]	0,006	0,006	0,010	0,006	0	0,021
	Nº de parasitos[c]	39,0	16,8	30,4	30,6	30,4	23,6
	%IC[d]	0	56,92	22,05	21,54	22,05	39,49

[a] Concentração final dos compostos, 10 µM;
[b] dp, desvio padrão;
[c] Concentração de parasitos x 10^6/mL;
[d] Porcentagem de inibição em relação ao controle (C+).

Para a cultura controle da cepa Colombiana, observa-se que, após 72h de incubação a 28 °C, no meio LIT-He atinge-se uma densidade de 72,6 x 10^6 parasitos/mL, ao passo que no meio LIT-Hb a densidade é de 39,0 x 10^6 parasitos/mL. Quando se analisa o efeito de 10 µM NFX nos dois meios (Tabela 06), verifica-se que no meio LIT-He o composto promove uma inibição do crescimento de 32,72%, que é menor do que a inibição do crescimento promovida por igual concentração de NFX na cepa Silvio X10.cl1 (48,39%, Tabela 04). Esses valores apoiam relatos anteriores que indicam maior resistência a NFX da cepa Colombiana. Por outro lado, no meio LIT-Hb, 10 µM NFX promove 56,92% de inibição

do crescimento de Colombiana (Tabela 06), inibição sensivelmente maior do que a observada para a cepa Silvio X10.cl1 neste mesmo meio (43,37%, Tabela 04).

Para a cepa Colombiana, assim como para Silvio X10.cl1, o composto SNR-02-03 apresentou a maior taxa de inibição (32,72% em LIT-He e 62,82% em LIT-Hb). Porém, ao contrário de Silvio X10.cl1 em que SNR-02-04 e SNR-02-06 não atuam, esses compostos inibiram o crescimento de Colombiana em 34,35% e 22,56%, respectivamente, apenas no meio LIT-Hb (Tabela 06). Os derivados de Oxadiazol, SNR-03-01, SNR-03-02 e SNR-03-04, apresentam cerca de 20% de inibição do crescimento e SNR-03-06, cerca de 40% apenas no meio LIT-Hb (Tabela 07). Curiosamente, nessas condições, a cepa Colombiana é mais sensível a esses derivados do que Silvio X10.cl1 (Tabela 05). Os valores de inibição do crescimento apresentados nas Tabelas 04 e 06 indicam que o composto SNR-02-03 é um composto promissor, tendo em vista que para NFX os valores obtidos de %IC foram similares aos do composto SNR-02-03 para ambas as cepas de *T. cruzi*.

O conjunto de dados indica que a formulação do meio LIT influi na definição da atividade de compostos anti-*T. cruzi*. Esse aspecto será discutido adiante.

O tempo de geração (TG) das culturas na fase exponencial de crescimento (os dados da curva de crescimento não são apresentados neste estudo) foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\mathrm{TG} = \frac{\Delta t \,.\log(2)}{\log\,(\text{concentração final de células}) - \log\,(\text{concentração inicial de células})} \qquad (2)$$

Onde: Δt é o intervalo de tempo, na fase exponencial, considerado na análise.

Os dados da Tabela 8 mostram um TG maior para ambas as cepas no meio LIT-Hb.

Tabela 08: Tempo de geração (em horas) das culturas das cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana em meio LIT-He e LIT-Hb.

Cepa	**LIT-He** (Média ± dp)	**LIT-Hb** (Média ± dp)
Silvio X10.cl1	20,0 ± 2,0	44,2 ± 3,5
Colombiana	25,2 ± 2,3	36,7 ± 2,8

3.3.1.4 Determinação da CI_{50} do composto SNR-02-03

Com base na atividade de derivados de Quinazolina e de Oxadiazol determinada acima, verifica-se que o único composto que apresentou atividade inibitória apreciável para ambas as cepas, na concentração de 10 µM, foi o composto SNR-02-03: no meio LIT-He, 34,10% (Silvio X10.cl1) e 32,72% (Colombiana), e, no meio LIT-Hb, 43,37% (Silvio X10.cl1) e 62,82% (Colombiana) (Tabelas 04 e 06). Por ser esse composto promissor, determinou-se o valor da CI_{50} para ambas as cepas (Tabela 11), variando-se sua concentração de 0 a 40 µM, no meio de cultura LIT-He (Tabelas 09 e 10). Com a assistência do programa *OriginPro8.0* (versão 8.0. SR00 - Trial, OriginLab Corporation: Northampton, MA, EUA, 2007, licença institucional) e, por meio deste, foram obtidos gráficos por regressão não linear, tipo sigmoidal (Figura 16).

Tabela 09: Efeito inibitório do composto SNR-02-03 sobre formas epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1.

		Concentração (µM)					
	C+	**1,25**	**2,5**	**5**	**10**	**20**	**40**
Abs. a 492 nm	0,32	0,31	0,30	0,27	0,22	0,14	0,12
dp[a]	0,010	0	0,150	0,006	0,006	0	0
Nº de parasitos[b]	107,3	103,9	100,0	90,1	72,9	45,3	38,4
%IC[c]	0	3,2	6,4	16,1	32,1	57,8	64,2

[a] dp, desvio padrão;
[b] Concentração de parasitos x 10^6/mL;
[c] Porcentagem de inibição em relação ao controle (C+).

Tabela 10: Efeito inibitório do composto SNR-02-03 sobre formas epimastigotas da cepa Colombiana.

		Concentração (µM)					
	C+	**1,25**	**2,5**	**5**	**10**	**20**	**40**
Abs. a 492 nm	0,48	0,46	0,43	0,37	0,29	0,16	0,13
dp[a]	0,006	0,006	0,012	0,006	0,006	0,010	0,010
Nº de parasitos[b]	75,21	72,18	67,64	58,55	46,42	26,73	22,18
%IC[c]	0,00	4,03	10,07	22,16	38,28	64,46	70,51

[a] dp, desvio padrão;
[b] Concentração de parasitos x 10^6/mL;
[c] Porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle (C+).

Tabela 11: Valores da CI_{50} do composto SNR-02-03 para as cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana.

Cepas	CI_{50} (µM) (Média ± dp)
Silvio X10.cl1	14,5 ± 1,7
Colombiana	13,7 ± 0,9

Embora não tenha sido determinada a CI_{50} de NFX, a Tabela 04 indica que na concentração de 10 µM, no meio LIT-He, esse composto inibe 48% do crescimento da cepa Silvio X10.cl1. Desta forma, os valores da CI_{50} de SNR-02-03 para as duas cepas seriam da mesma ordem de grandeza da CI_{50} de NFX.

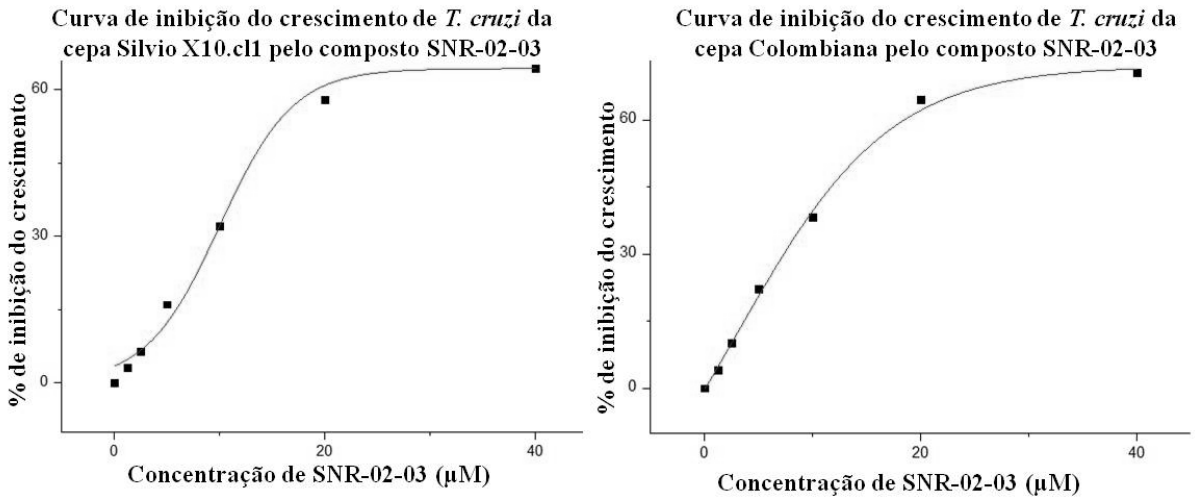


Figura 16: Curvas de inibição do crescimento das cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana de *T. cruzi* pelo composto SNR-02-03.

3.3.2 Avaliação da citotoxicidade do composto SNR-02-03 para células LLC-MK2

Tendo em vista a atividade promissora do composto SNR-02-03, foi analisada sua citotoxicidade para células LLC-MK2. As monocamadas foram incubadas por 72h a 37 °C, com diferentes concentrações do composto (0 a 160 µM). Como controle da eficiência do ensaio, as monocamadas foram incubadas com azida sódica (0,3 µM), conhecido inibidor da citocromo *oxidase*, e, consequentemente da fosforilação oxidativa. A citotoxicidade foi determinada com base na redução do MTT a um composto colorido, denominado formazan (Tabela 12).

Tabela 12: Absorbância do formazan produzido por células LLC-MK2 incubadas com diversas concentrações do composto SNR-02-03[a].

	C+	C-	Concentração do SNR-02-03 (µM)				
	0	**0,3**	**5**	**10**	**40**	**80**	**160**
Abs. a 590 nm	0,879	0,254	0,225	0,310	0,146	0,074	0,071
dp[b]	0,083	0,008	0,034	0,079	0,014	0,004	0,008
% inibição[c]	0	71,13	74,41	64,78	83,43	91,62	91,89

[a] Média e desvio padrão obtidas a partir de 3 réplicas de um único ensaio;
[b] dp, desvio padrão;
[c] Porcentagem de inibição em relação ao controle (C+);
[d] Controle negativo (C-), azida sódica a 0,3 µM.

Os dados mostram que o composto SNR-02-03 apresenta elevada citotoxicidade para as células de mamífero em cultura, obtendo-se uma inibição da ordem de 70% com concentrações de 5 e 10 µM. O mesmo nível de citotoxicidade foi obtido com 0,3 µM de azida sódica.

3.3.3 Análise do coeficiente de partição dos derivados de quinazolina e oxadiazol e modelos moleculares tridimensionais

As características de hidrofobicidade são um dos possíveis fatores que poderiam ter influído na atividade anti-*T. cruzi* dos compostos investigados. Para definir a natureza hidrofóbica ou hidrofílica de determinado composto utiliza-se o parâmetro P, que corresponde ao seu coeficiente de partição octanol/água. O valor de P indica a tendência preferencial do composto de dissolver-se em uma fase oleosa (lipossolubilidade) ou aquosa (hidrossolubilidade). O logaritmo desse coeficiente é representado por CLogP: quanto maior for valor de CLogP, mais hidrofóbico é o composto, e quanto menor, mais hidrofílico (Figura 17). Compostos com CLogP mais elevados têm maior facilidade de permear as membranas celulares (LIPINSKI et al. 1997; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1998).

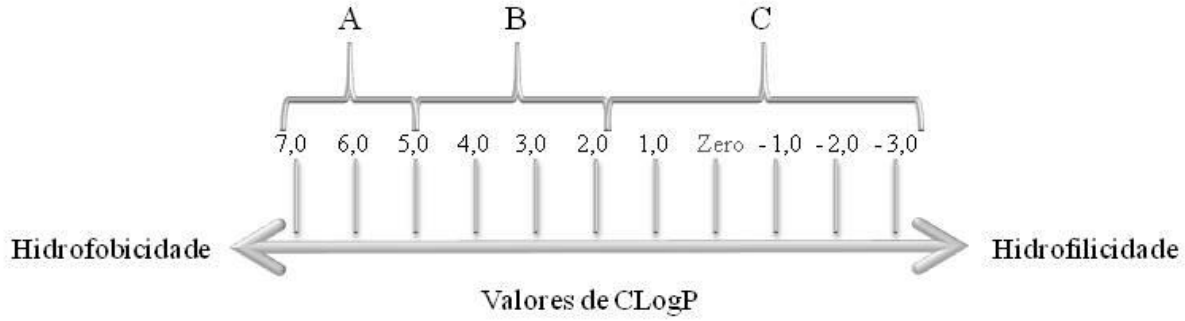


Figura 17: Desenho esquemático para identificação dos valores ideais de CLogP para fármacos. A: valores de 7 a 5, fármacos tendem a ficar retidos nas membranas; B: valores de 2 a 5 correspondem à faixa recomendada para um fármaco eficaz; C: valores de 2 a -3 dificultam a permeação dos fármacos pelas membranas biológicas. Adaptado de Masunari e Tavares (2006).

Os valores de CLogP dos derivados de Quinazolina e Oxadiazol (Figura 18) foram determinados conforme descrito em Materiais e Métodos. Dois derivados da Quinazolina (SNR-02-02 e SNR-02-06) e um derivado de Oxadiazol (SNR-03-01) apresentam valores de CLogP na faixa de 1,2 a 1,9, propondo maior grau de hidrofilicidade e, portanto, dificuldade de permeação por membranas biológicas. Três derivados da Quinazolina (SNR-02-03; SNR-02-04 e SNR-02-05) e dois derivados de Oxadiazol (SNR-03-02 e SNR-03-06) apresentam valores de CLogP entre 3,5 e 4,2, indicando facilidade de permear membranas biológicas e atingir o meio intracelular. No entanto, os resultados apresentados anteriormente indicam que apenas o composto SNR-02-03 (CLogP 3,86) teve atividade tripanocida, o que sugere que outros fatores, além de sua capacidade de penetrar na célula, determinam seu modo de ação. Por outro lado, deve ser lembrado que o valor de CLogP não foi determinado experimentalmente, mas sim, utilizando-se programas computacionais específicos.

Além da estimativa do valor de CLogP dos compostos, os modelos moleculares 3D dos mesmos foram construídos, conforme descrito em Materiais e Métodos, mostrando a distribuição de regiões de maior ou menor hidrofobicidade em cada composto (Figura 18).

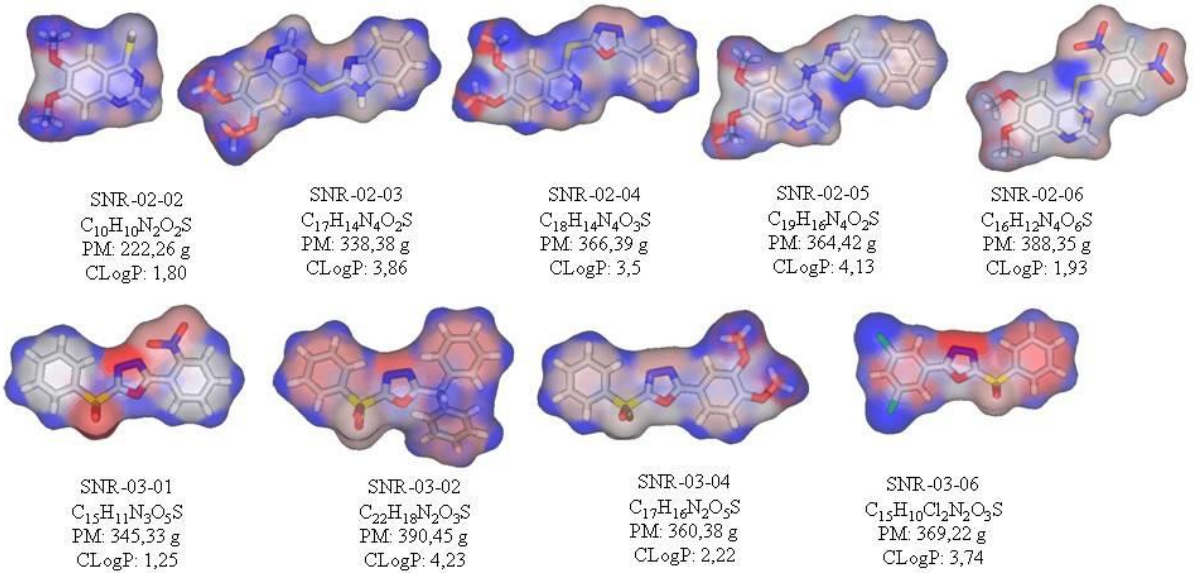


Figura 18: Mapa do potencial lipofílico dos compostos derivados de Quinazolina e Oxadiazol. CLogP foi calculado no programa *Marvin 5.0.4.1*. O esquema de coloração na representação 3D da molécula indica: em vermelho, regiões de maior hidrofilicidade; em cinza, regiões de maior hidrofobicidade; e em azul, regiões intermediárias.

3.4 CONCLUSÕES

Neste subprojeto foi investigada a atividade de quatro derivados de Quinazolina e de quatro derivados de Oxadiazol contra formas epimastigotas de duas cepas de *T. cruzi*. Apenas o composto 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-iltio)-6,7-imetoxiquinazolina (SNR-02-03) mostrou atividade tripanocida promissora com valores de CI_{50} de 14,5 e 13,7 µM para as cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana, respectivamente. Esse composto apresentou elevada atividade citotóxica para células LLC-MK2 mesmo em baixa concentração (5 µM). Apesar de o composto apresentar valores de CLogP que propiciariam sua permeação em membranas biológicas, sua elevada toxicidade também para células de mamíferos não o tornam um composto promissor para o tratamento de DC.

Por outro lado, neste subprojeto foi possível demonstrar que os compostos exibem diferenças em suas atividades inibitórias quando avaliados em duas formulações de meio LIT. Os dados sugerem que no meio de cultura mais pobre em nutrientes (LIT-Hb), no qual o tempo de geração da cultura é maior, os compostos apresentam maior atividade tripanocida para a cepa Colombiana e a mesma atividade para a cepa Silvio X10.cl1. Desta forma, recomenda-se não comparar valores absolutos de CI_{50} de um determinado composto cuja atividade foi avaliada em meios de cultura e condições experimentais diferentes.

4 SUBPROJETO 2: SENSIBILIDADE A BENZNIDAZOL EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE E EM REPRESENTANTES DO GÊNERO *TRYPANOSOMA*. ANÁLISE DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A BZ

4.1 JUSTIFICATIVA

Conforme relatado anteriormente, nesse subprojeto buscou-se abordar o tema da resistência natural de cepas de *T. cruzi* a BZ de forma indireta, investigando a sensibilidade (ou a resistência natural) a BZ em tripanossomatídeos.

Os componentes moleculares envolvidos na resistência natural a BZ ou na resistência selecionada *in vitro* foram investigados em *T. cruzi* por diferentes abordagens: sequenciamento gênico, hibridização diferencial em microarranjos de DNA, proteômica, superexpressão ou silenciamento de certos genes. A identificação de genes que apresentam alterações estruturais ou expressão diferencial em parasitos sensíveis e em parasitos com resistência natural ou selecionada pode proporcionar o entendimento da base molecular da resistência a drogas, aumentando o foco para o aperfeiçoamento da quimioterapia para a DC.

A maior parte dos estudos investigou diferenças entre os genes de cepas selvagens e de cepas com resistência a BZ selecionada *in vitro* (aqui abreviada como RS).

A perda de um dos alelos do gene que codifica a *Tc*NTR, nitroredutase de tipo I que ativa nitroderivados, e mutações no alelo remanescente foram descritas em cepas com RS (WILKINSON et al. 2008; MEJIA et al. 2012). Por outro lado, tais alterações no gene da *Tc*NTR não foram observadas em isolados de *T. cruzi* naturalmente resistentes a BZ (MEJIA et al. 2012).

A *old yellow enzyme* (OYE) foi isolada de leveduras em 1933 (WARBURG; CHRISTIAN, 1933). A enzima recebeu este nome em função da cor amarela conferida por seu cofator FMN. Este é rapidamente reduzido por NAD(P)H e reoxidado por oxigênio. Além de leveduras, OYE foi identificada em plantas e em bactérias, mas sua função não é totalmente conhecida. Em 2002, foi verificada a presença de OYE em *T. cruzi* (*Tc*OYE), e caracterizado o gene que a codifica e que apresenta 16 a 28% de identidade com OYEs descritas anteriormente (KUBATA et al. 2002). A enzima *Tc*OYE recombinante atua na síntese da prostaglandina F2α (sendo por isto também denominada prostaglandina F2α sintase) e na redução de naftoquinonas e de compostos nitroheterocíclicos (KUBATA et al. 2002). Assim como a *Tc*NTR, *Tc*OYE é uma nitroredutase de tipo I, que, porém, ativa NFX

em condições anaeróbicas (KUBATA et al. 2002). Murta et al. (2006) detectaram menor quantidade de transcritos do gene de *Tc*OYE (Genbank U31282) em cepas com RS.

Conforme descrito na Introdução, superóxido dismutases (SOD) são um grupo de metaloenzimas que participam de mecanismos de defesa de muitos organismos, removendo o excesso de radicais superóxido via dismutação em gás oxigênio e H_2O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1988). De acordo com seu cofator, as SODs são classificadas em três tipos: Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD. Em tripanossomatídeos, apenas FeSODs foram descritas, tendo sido caracterizados quatro genes, denominados *FeSOD-A*, *FeSOD-B1*, *FeSOD-B2* e *FeSOD-C*, em seus genomas (DUFERNEZ et al. 2006). Em *T. cruzi*, radicais superóxido seriam formados a partir da ativação de nitroderivados por nitroredutases (MORENO et al. 1982). Utilizando diferentes abordagens, Nogueira et al. (2006) descreveram a amplificação e aumento de transcritos do gene *Tc*FeSOD-A (GenBank AAX84934.1), assim como a expressão dessa enzima em cepas com RS. Essa adaptação promoveria a detoxificação de radicais superóxido, tornando o parasito mais resistente à ação dos compostos.

Que seja de nosso conhecimento, apenas nosso laboratório investigou genes diferencialmente expressos em cepas sensíveis e naturalmente resistentes a BZ. Dentre os genes diferencialmente expressos, o gene que codifica um transportador ABC (*ATP Binding Cassette*) da subfamília G, *Tc*ABCG1 (Genbank XM_813521.1), mostrou níveis de transcritos significativamente aumentados em cepas naturalmente resistentes (ZINGALES et al. 2015). Este gene apresenta SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) entre as cepas (FRANCO et al. 2015). A transfecção do gene de cepas resistentes a BZ em uma cepa sensível, aumentou, em cerca de 50%, sua resistência ao fármaco (ZINGALES et al. 2015), sugerindo que esse transportador poderia atuar no efluxo de BZ para fora do parasito. Ortólogos do transportador *Tc*ABCG1 foram identificados em *Leishmania* spp. e em tripanosomas Africanos (FRANCO et al. 2015), embora sua função biológica ainda não tenha sido caracterizada.

4.2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse subprojeto é fazer um mapeamento da sensibilidade natural a benznidazol em tripanossomatídeos e analisar *in silico* possíveis elementos envolvidos na sensibilidade/resistência a esse fármaco. Esse estudo poderá contribuir para o entendimento de fatores que determinem a resistência natural de *T. cruzi* a BZ.

Objetivos específicos:

a) Analisar a sensibilidade a BZ *in vitro* em espécies da família Trypanosomatidae e em representantes de clados do gênero *Trypanosoma*;
b) Resgatar as sequências dos genes *OYE*, *NTR*, *FeSOD-A* e *ABCG1* de bancos de dados e realizar análises *in silico*;
c) Realizar análises filogenéticas baseadas nas sequências proteicas dos genes especificados acima.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Organismos

As características dos tripanossomatídeos cuja sensibilidade *in vitro* a BZ foi investigada são descritas na Tabela 13. Na Tabela também se identificam os pesquisadores que cederam os inóculos.

4.3.1.1 Curvas de crescimento e cálculo do tempo de geração

Os organismos foram cultivados nos meios de cultura e temperaturas especificados em Resultados, em garrafas de plástico (TPP, Suíça) em estufa BOD. O tempo de geração das culturas (TG) foi determinado, na fase exponencial de crescimento, a partir de curvas de crescimento realizadas com três réplicas técnicas e, em alguns casos, com réplicas biológicas, e iniciadas com inóculos contendo número definido de organismos. As curvas de crescimento foram determinadas nas mesmas condições em que o ensaio de sensibilidade a BZ foi realizado. Ou seja, em placas de 96 cavidades de fundo plano, com um volume de 200 µL por cavidade, na temperatura ideal de crescimento de cada organismo. A cada dia, a concentração de tripanossomatídeos foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer. Para determinar o TG, foi utilizada a Equação 2, descrita no Subprojeto 1.

4.3.1.2 Obtenção de imagens dos organismos

A cultura foi centrifugada e lavada duas vezes com PBS, pH 7,4. Um esfregaço contendo um número adequado de organismos foi aplicado à lamina; secado à temperatura ambiente e fixado com Metanol PA (100%). As lâminas foram submersas em Giemsa diluído pelo tempo necessário e, em seguida, lavadas por imersão em água. Após secagem, a cada lâmina foram adicionadas gotas de Entellan® e lamínula. As fotos foram obtidas em aumento de 1000x em microscópio ótico (Nikon) com o auxílio de uma câmera fotográfica acoplada.

Tabela 13: Características dos parasitos.

Espécie	Cepa/Isolado	Gênero (Subgênero)	Hospedeiro		Forma
T. cruzi [A]	Silvio X10.cl1 Colombiana	*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)	Humano	*Homo sapiens*	Epimastigota
T. c. marinkellei [B]	TCC 344	*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)	Morcego	*Carollia perspicillata*	Epimastigota
T. rangeli [B]	TCC 086 AM 80	*Trypanosoma* (*Herpetosoma*)	Humano	*Homo sapiens*	Epimastigota
T. dionisii [B]	TCC 211	*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)	Morcego	*Eptesicus brasiliensis*	Epimastigota
T. brucei brucei [C]	Lister 427	*Trypanosoma*	Humano	*Homo sapiens*	Procíclico
L. (L.) infantum [D]	LD/1972/WT	*Leishmania (Leishmania)*	Humano	*Homo sapiens*	Promastigota
L. (V.) braziliensis [D]	MHOM/BR/1975/M2903	*Leishmania (Viannia)*	Humano	*Homo sapiens*	Promastigota
L. (L.) enriettii [B]	TCC 2753	*Leishmania (Leishmania)*	Porquinho-da-índia	*Cavia aperea*	Promastigota
L. (L.) tarentolae [B]	TCC 017 E	*Leishmania (Leishmania)*	Lagartos		Promastigota
C. fasciculata [B]	TCC 039E	*Crithidia*	Diptera, Hemiptera e Himenoptera	*Culex pipiens*	Coanomastigota
A. deanei [B]	TCC 036 E	*Angomonas*	Hemiptera	*Zelus leucogrammus*	Coanomastigota
S. galati [B]	TCC 219	*Strigomonas*	Diptera	*Lutzomya almerioi*	Flagelados polimórficos
P. serpens [B]	TCC 060 E	*Phytomonas*	Tomate	*Lycopersicon esculentum*	Promastigota
Paratrypanosoma sp.[B]	TCC 2913	*Paratrypanosoma*	Percevejo	*Ricolla* sp.	Promastigota

Procedência dos inóculos: [A], Prof.a D.ra Bianca S. Zingales (IQ-USP); [B], Prof.a D.ra Marta Maria G. Teixeira (ICB-USP); [C], Prof. D.r Sérgio Schenkman (DMIP-UNIFESP); [D], Prof.a D.ra Silvia R. B. Uliana (ICB-USP). TCC: *Trypanosomatid Culture Collecction*.

4.3.2 Sensibilidade a BZ

A sensibilidade a BZ foi determinada em organismos em fase exponencial de crescimento. Os organismos foram incubados com diferentes concentrações de BZ (especificadas em Resultados), em placas de 96 cavidades de fundo plano e em volume final de 200 µL, no meio de cultura e temperatura adequadas por 72h, com réplicas técnicas e biológicas.

4.3.2.1 Sensibilidade a BZ determinada com o ensaio do MTT

O ensaio do MTT, utilizado no Subprojeto 1 para monitorar a citotoxicidade em células LLC-MK2, foi padronizado para os protozoários estudados.

Após exposição dos parasitos a diferentes concentrações de BZ, 10 µL de MTT (5 mg/mL em PBS, pH 7,4) foram adicionados a cada amostra, seguindo-se incubação adicional de 2h na temperatura de cultivo (25 ou 28 °C). Em seguida, a microplaca foi centrifugada a 4000 xg por 10min e 150 µL do sobrenadante de cada amostra foram retirados e descartados. Adicionou-se 100 µL de DMSO pré-aquecido em banho a 56 °C. A microplaca foi homogeneizada por 30min, no escuro à temperatura ambiente por agitação. A coleta de dados foi realizada no comprimento de onda de 590 nm em leitor de ELISA (Epoch da BioTek Instruments).

4.3.2.2 Cálculo CI_{50} para BZ

Assim como no Subprojeto 1, a CI_{50} para BZ de parasitos sensíveis ao fármaco foi determinada com o programa *OriginPro8.0* (versão 8.0. SR00 - Trial, OriginLab Corporation: Northampton, MA, EUA, 2007, licença institucional).

4.3.3 Captação de BZ

A captação de BZ por formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (LD/1972/WT), por epimastigotas de *T. cruzi* (Silvio X10.cl1) e por formas promastigotas de *P. serpens* (TCC 060 E) foi investigada utilizando-se o método de Boiani et al. (2010), com algumas modificações. Os parasitos, cultivados nos respectivos meios e em fase exponencial de crescimento, foram lavados duas vezes com meio A/G (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4

8 mM; KH_2HPO_4 15 mM; glicose 10 mM) contendo 10 mg/mL de soroalbumina bovina (BSA) e ressuspensos neste meio na concentração final de 10^8 parasitos/mL. As suspensões foram incubadas por 1h, com leve agitação, nas temperaturas especificadas em Resultados. Em seguida, foi adicionado BZ, sendo retiradas alíquotas de 1,5 mL em diferentes tempos, que foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 14 000 xg por 3min. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Cary 60 UV-Vis – Varian) com o auxílio do programa Cary Win UV versão 5.0.0.999 (Agilent Technologies, Austrália PTY Ltda. 2011) no comprimento de onda de 324 nm. A quantidade de composto interiorizada em cada tempo foi calculada a partir da redução da absorbância do meio em relação ao valor da absorbância no tempo 0min, levando-se em consideração o valor do coeficiente de absortividade molar (ε) de BZ, ε_{324nm} = 14 920 $M^{-1}cm^{-1}$ (Equação 3).

$$Q_{(M)} = \frac{Abs.t_0 - Abs.t_x}{\varepsilon} \quad (3)$$

Onde: $Q_{(M)}$ = Quantidade de composto interiorizada (Molar);
$Abs.t_0$ = Absorbância do meio no tempo 0min;
$Abs.t_x$ = Absorbância do meio no tempo Xmin;
ε = Coeficiente de absortividade molar.

4.3.4 Análises Filogenéticas

4.3.4.1 Características das proteínas utilizadas

Quatro proteínas foram selecionadas para verificar seu potencial em determinar o surgimento da sensibilidade/resistência a BZ em tripanossomatídeos. As características dos genes e proteínas da cepa CL Brener de *T. cruzi* são descritas na Tabela 14.

Tabela 14: Características dos genes e proteínas *Tc*NTR, *Tc*ABCG1, *Tc*OYE e *Tc*FeSOD-A da cepa CL Brener.

Proteína	GENE			PROTEÍNA	
	Acesso GenBank	Tamanho (pb[a])	Número de cópias[b]	Acesso GenBank	Número de Aminoácidos
*Tc*NTR[c]	XM_805552.1	939	1	XP_810645.1	312
*Tc*ABCG1[d]	XM_813521.1	1 998	1	XP_818614.1	665
*Tc*OYE[e]	XM_816510.1	1 140	2	XP_821603.1	379
*Tc*FeSOD-A[f]	XM_807064.1	702	2	XP_812157.1	233

[a] pb, pares de bases;
[b] No genoma haploide;
[c] haplótipo Esmeraldo (WILKINSON et al. 2008);
[d] haplótipo não-Esmeraldo (ZINGALES et al. 2015);
[e] haplótipo não-Esmeraldo (MURTA et al. 2006);
[f] haplótipo Esmeraldo (NOGUEIRA et al. 2006).

4.3.4.2 Análise e alinhamento das sequências

Homólogos das proteínas foram encontrados a partir de buscas por similaridade nos dados genômicos disponíveis em bancos de dados públicos - GenBank e TryTripDB - e em bancos do projeto AToL (*Assembly of Tree of Life*) da NSF (*National Science Foundation*, EUA), conforme indicado na Tabela 15.

O programa *EMBOSS explorer* (getorf, versão 2.2.0, SourceForce, 2006) foi utilizado para obter as sequências das fases de leitura aberta (ORF: *Open Reading Frame*) das sequências de nucleotídeos com tamanho mínimo de 150 nucleotídeos. Buscas por similaridade foram realizadas com o programa *BLAST* (tBlastn - NCBI) utilizando como "iscas" (*queries*) as sequências descritas na Tabela 14 e um *cutoff* de *e-value* de $1e^{-10}$. As sequências putativas obtidas foram convertidas em proteínas por tradução *in silico*, alinhadas com o auxílio do programa *Clustal Omega* (versão 1.2.2, Clustal, 2016) (SIEVERS et al. 2011) e visualizadas no programa *Seaview* (versão 3.2, PRABI, 2014) (GALTIER; GOUY; GAUTIER, 1996).

Os Domínios Conservados das "iscas" foram utilizados como referências positivas no *CDD* (*Conserved Domains Database* - NCBI) (MARCHLER-BAUER et al. 2014) para atestar a fidelidade das sequências identificadas. As sequências falso-positivas

foram eliminadas. As sequências que não apresentaram ou que sofreram deleção de sítios relevantes de cada enzima foram removidas e as demais foram analisadas quanto às alterações (substituições) nestes sítios. Assim, foram obtidos os ortólogos e parálogos, os quais foram alinhados novamente com o *Clustal Omega* (SIEVERS et al 2011), produzindo um alinhamento múltiplo de sequências (MSA: *Multiple Sequence Alignment*). Na ausência de ortólogos identificados, a busca foi repetida diretamente nas sequências genômicas (*contigs* e *scaffolds*) para encontrar as sequências fragmentadas em mais de um segmento genômico (*contig*), e que estariam ausentes nas fases de leitura abertas obtidas anteriormente com o programa *getorf*.

Tabela 15: Genomas de tripanossomatídeos e de *Bodo saltans* utilizados neste estudo.

Organismo	Cepa/Isolado	Banco	Número de acesso
Trypanosomatida			
Trypanosoma cruzi	CL Brener	TriTrypDB	
Trypanosoma cruzi	Silvio X10.cl1	GenBank	ADWP00000000
Trypanosoma cruzi	Dm28c	GenBank	AYLP00000000.1
Trypanosoma cruzi marinkellei	TCC 344	AToL	
Trypanosoma cruzi marinkellei	B7	GenBank	AHKC00000000.1
Trypanosoma brucei brucei	Lister 427	TriTrypDB	
Trypanosoma brucei brucei	TREU927	TriTrypDB	
Trypanosoma brucei gambiense	DAL972	TriTrypDB	
Trypanosoma congolense	IL3000	TriTrypDB	
Trypanosoma evansi	STIB 805	TriTrypDB	
Trypanosoma vivax	Y486	GenBank	CAEX00000000.1
Trypanosoma livingstonei	TCC 1270	AToL	
Trypanosoma rangeli	AM80	AToL	
Trypanosoma rangeli	SC 58	GenBank	AUPL00000000.1
Trypanosoma dionisii	TCC 211	AToL	
Trypanosoma erneyi	TCC 1946	AToL	
Phytomonas serpens	9T	GenBank	AIHY00000000.1
Angomonas deanei	TCC 036E	GenBank	AUXM00000000.1
Strigomonas galati	TCC 219	GenBank	AUXN00000000.1
Crithidia fasciculata	Cf-Cl	GenBank	AODS00000000.2
Leishmania (L.) enriettii	LEM3045	GenBank	ATAF00000000.2
Leishmania (V.) braziliensis	MHOM/BR/75/M2903	GenBank	AOSE00000000.1
Leishmania (L.) major	Friendlin	TriTrypDB	
Leishmania (L.) tarentolae	ParrotTarII	TriTrypDB	
Leishmania (L.) infantum	JPCM5	GenBank	CACT00000000.1
Bodonida			
Bodo saltans	ATCC 30905	GenBank	CYKH00000000.1

4.3.4.3 *Reconstrução de genealogias*

As árvores filogenéticas de cada proteína foram criadas a partir dos MSA por estimação de máxima verossimilhança (MLE: M*aximum Likelihood Estimation*) com o uso do programa *RAxML* (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*, versão 8.2.0, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, 2016) (STAMATAKIS, 2014), o qual escolheu automaticamente fazer o alinhamento das sequências de aminoácidos com o AIC (*Akaike Information Criterion*) com o uso do programa *ProtTest* (versão 3.4.2) (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005). A verificação de acurácia quanto ao grau de sustentação dos ramos das árvores obtidas foi mensurado pela análise de *Bootstrap*, com o programa *PAUP** (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, versão 4.0) (SWOFFORD, 2002), com 1000 pseudo-réplicas. As árvores foram visualizadas e editadas com o auxílio dos programas *Figtree* (versão 1.4.3, BEAST Developers, 2017) e *InkScape* (versão 0.92.1, 2017).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Organismos e condições de cultivo

Os organismos estudados compreendem um grupo de protozoários pertencentes à família Typanosomatidae (antiga ordem Kinetoplastida) (Figura 19), a qual inclui parasitos obrigatórios somente de insetos (monogenéticos), de insetos e vertebrados (digenéticos), e de insetos e plantas (digenéticos) (STEVENS, 2008). Neste subprojeto a sensibilidade a BZ foi investigada em representantes dos gêneros *Trypanosoma, Leishmania, Phytomonas, Crithidia, Angomonas, Strigomonas* e *Paratrypanosoma*, identificados na Figura 19. Algumas das espécies de cada gênero, onde esse parâmetro foi analisado, são assinaladas na Figura 20 que representa o consenso atual das relações filogenéticas de Kinetoplastídeos (JACKSON, 2015).

A seguir, visando investigar a sensibilidade a BZ, foram caracterizados alguns parâmetros do crescimento das culturas dos organismos selecionados.

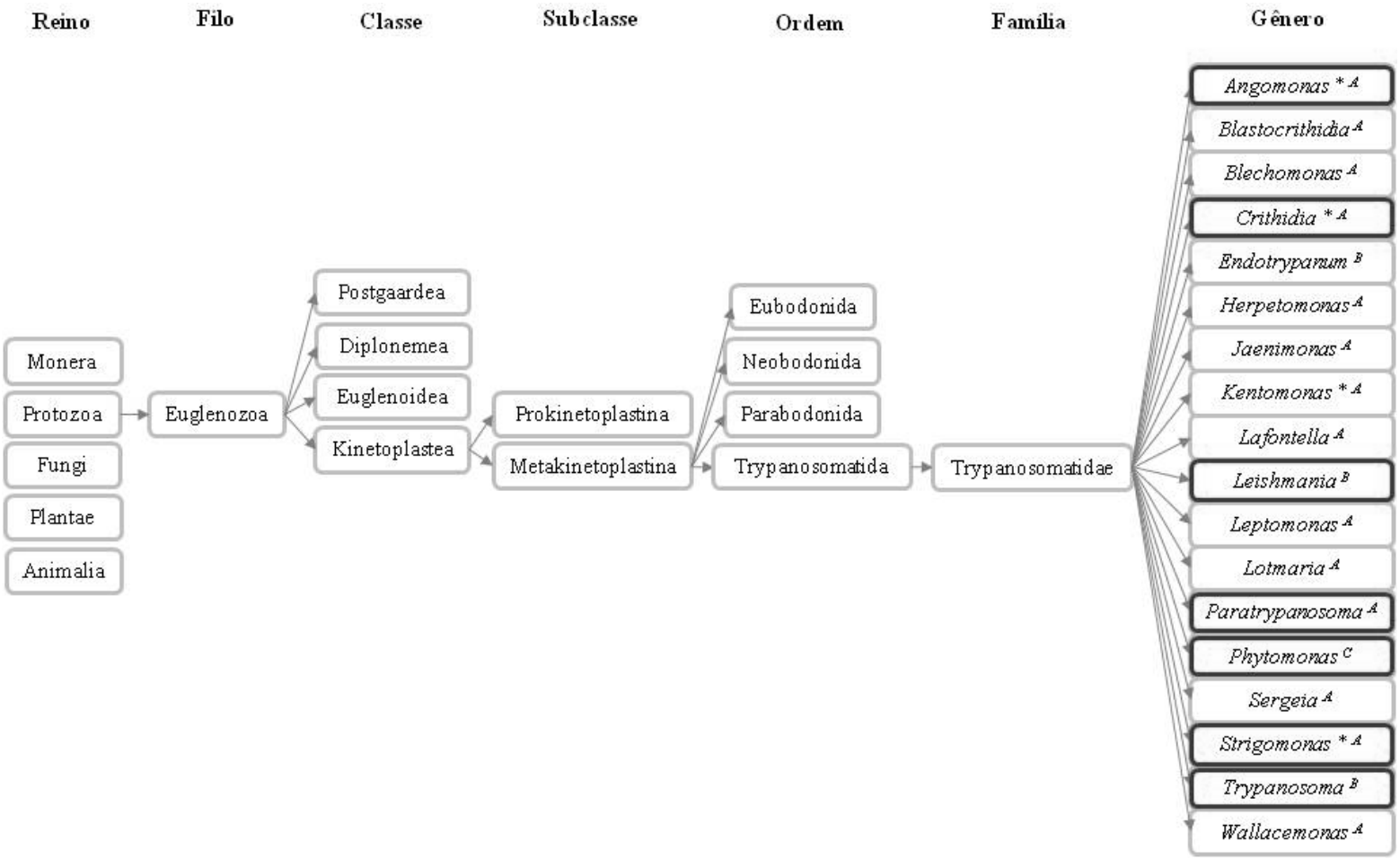


Figura 19: Esquema da classificação de gêneros da família Trypanosomatidae. Parasitos: ^{A}: Monogenéticos – insetos; ^{B}: Digenéticos – insetos e vertebrados; ^{C}: Digenéticos – insetos e plantas. Os gêneros cujos representantes foram investigados nesse estudo são identificados. O asterisco (*) indica gêneros que possuem uma estreita relação com endossimbiontes bacterianos (MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA; VICKERMAN, 2004; STEVENS, 2008).

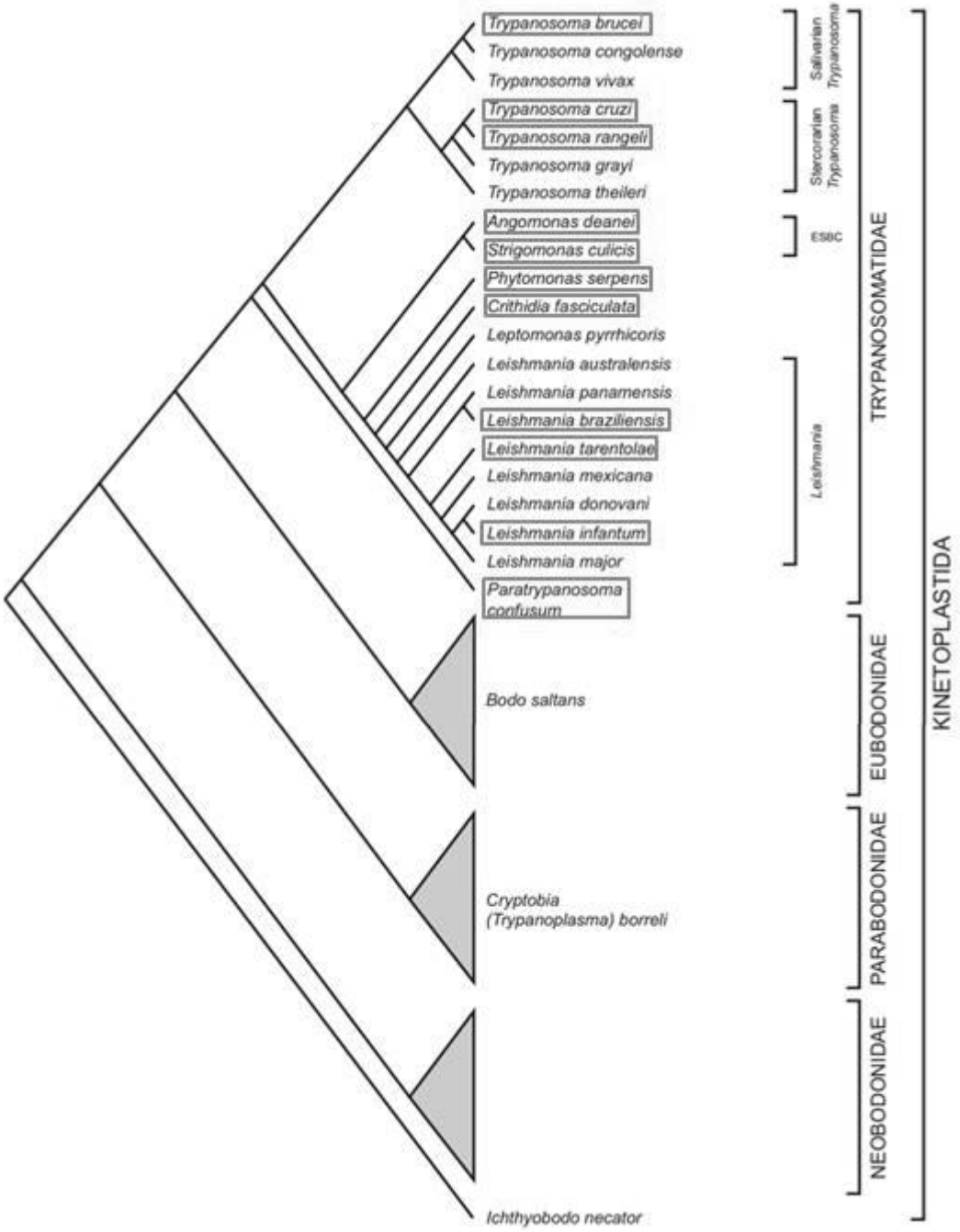


Figura 20: Cladograma que ilustra o consenso atual das relações filogenéticas de Kinetoplastídios. Figura adaptada de Jackson (2015). Os retângulos indicam algumas das espécies cuja sensibilidade a BZ foi investigada.

4.4.1.1 Gênero Trypanosoma

Pertencem ao gênero *Trypanosoma* (Figura 21) agentes causadores de infecções humanas relevantes, tais como a DC e a doença do sono, também denominada tripanossomíase Africana humana, causada, respectivamente, pelo *T. cruzi* e pelo *T. brucei*. Pertencem também a esse gênero *T. rangeli*, que infecta humanos, mas que, aparentemente, não causa patologias e espécies de *Trypanosoma* que infectam morcegos, como por exemplo *T. c. marinkellei* e *T. dionisii* (HAMILTON; TEIXEIRA; STEVENS, 2012).

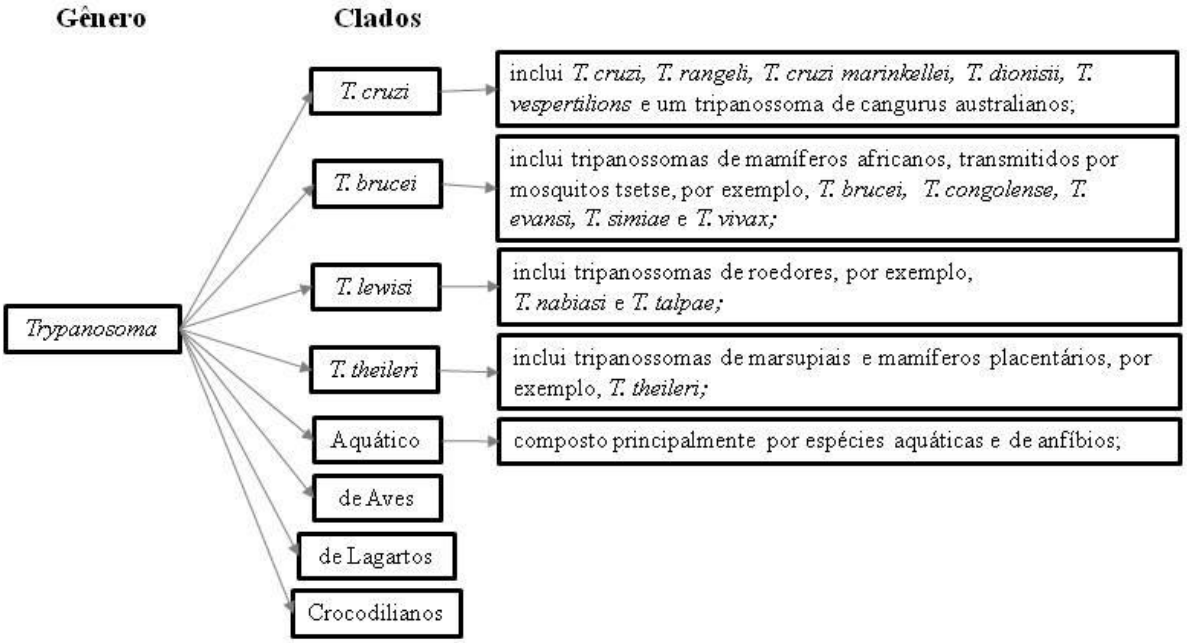


Figura 21: Esquema da distribuição de clados no gênero *Trypanosoma*. Adaptado de Hamilton, Gibson e Stevens. (2007).

Conforme descrito anteriormente, no que se refere à sensibilidade a nitroderivados, há cepas de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao BZ e NFX. Apenas dois relatos descrevem a atividade de BZ sobre formas promastigotas ou sanguíneas de *T. brucei* (PRATHALINGHAM et al. 2007; WILKINSON et al. 2008), sendo que apenas NFX é usado no tratamento da tripanossomíase Africana humana (KEATING et al. 2015).

Para *T. rangeli* foi descrito que NFX negativa a parasitemia na infecção murina, mas não há relatos da atividade de BZ nesse organismo (MARINKELLE, 1982). A atividade do BZ em *T. c. marinkellei* não foi investigada, ao contrário do que foi descrito em *T. dionisii* em que 10 µg/mL de BZ inibem a proliferação de formas intracelulares (BAKER; SELDEN,

1981). O conjunto de observações justifica a necessidade de investigar a sensibilidade a BZ em representantes do gênero *Trypanosoma.*

4.4.1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

Duas cepas humanas de *T. cruzi* foram escolhidas para estudo, uma mais sensível a BZ (Silvio X10.cl1) e outra considerada naturalmente resistente a este fármaco (Colombiana) (FILARDI e BRENER, 1987). Ambas as cepas foram cultivadas em meio LIT-He 10% SFB, a 28 °C. Na Figura 22 estão os registros fotográficos desses parasitos em fase exponencial de crescimento e a curva de crescimento, partindo-se de um inóculo inicial de 10^7 parasitos/mL. Os valores do TG das culturas são apresentados na Tabela 16.

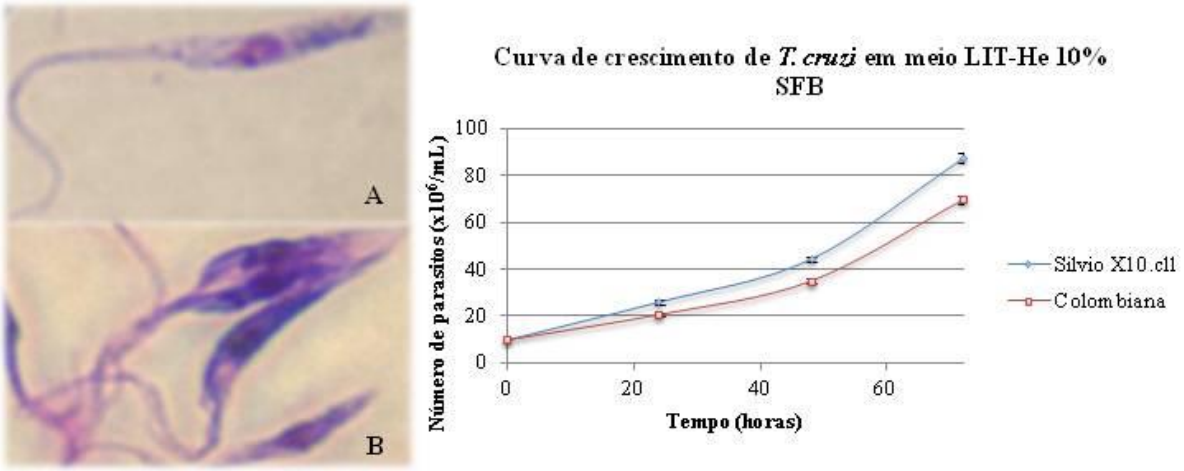


Figura 22: Registro fotográfico e curva de crescimento das cepas Silvio X10.cl1 (A) e Colombiana (B). As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Culturas mantidas em meio LIT-He 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial: 10^7 parasitos/mL.

4.4.1.1.2 *Trypanosoma rangeli*

A cepa de *T. rangeli* utilizada, TCC 086 AM80, é proveniente de caso humano da Amazônia, e foi cedida pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP). O cultivo deste parasito requer um meio mais rico em nutrientes do que o meio utilizado para cultivar *T cruzi*. Esse meio, denominado LIT-Es (Meio LIT com formulação Especial) 10% SFB, foi cedido pela M.a Marta Campaner, técnica do Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos da Prof.a D.ra Marta Teixeira (APÊNDICE B). Formas epimastigotas

foram cultivadas a 28 °C. Na Figura 23 mostra-se o registro fotográfico dos parasitos e a curva de crescimento, partindo-se de um inóculo inicial de 10^6 parasitos/mL e 2 x 10^6 parasitos/mL. Os valores do TG das culturas são apresentados na Tabela 16.

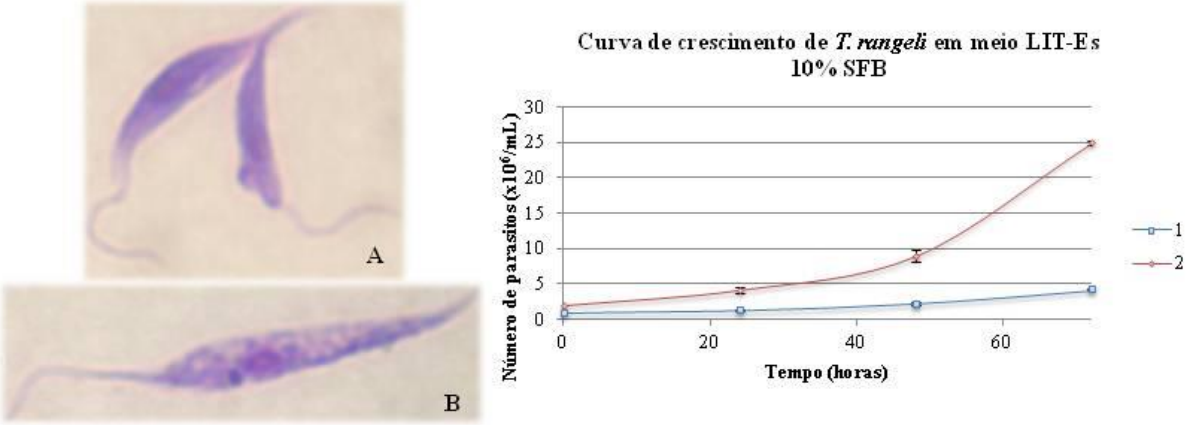


Figura 23: Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. rangeli*. As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos: A: em divisão e B: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 1 x 10^6 e 2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.1.3 *Trypanosoma dionisii*

A cepa de *T. dionisii* utilizada, TCC 211, é proveniente de morcego coletado em São Paulo, e foi cedida pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP). A forma epimastigota foi cultivada em meio LIT-Es 10% de SFB a 28 °C. Uma das características da cultura é que os parasitos formam rosetas aderidas ao fundo da garrafa na qual são mantidos. Para a contagem dos parasitos é necessário desfazer as rosetas por pipetagens sucessivas.

Na Figura 24 A mostra-se o registro fotográfico da forma epimastigota em divisão. Nos painéis B e C é possível observar uma peculiaridade do *T. dionisii*, já relatada por Lima et al. (2012), que consiste na migração do cinetoplasto para o lado oposto ao flagelo conforme a cultura sai da fase exponencial e entra na fase estacionária. Na Figura 24 registram-se também as curvas de crescimento obtidas com inóculos iniciais de 0,2 x 10^6 e de 2 x 10^6 parasitos/mL. Os valores do TG das duas culturas constam na Tabela 16.

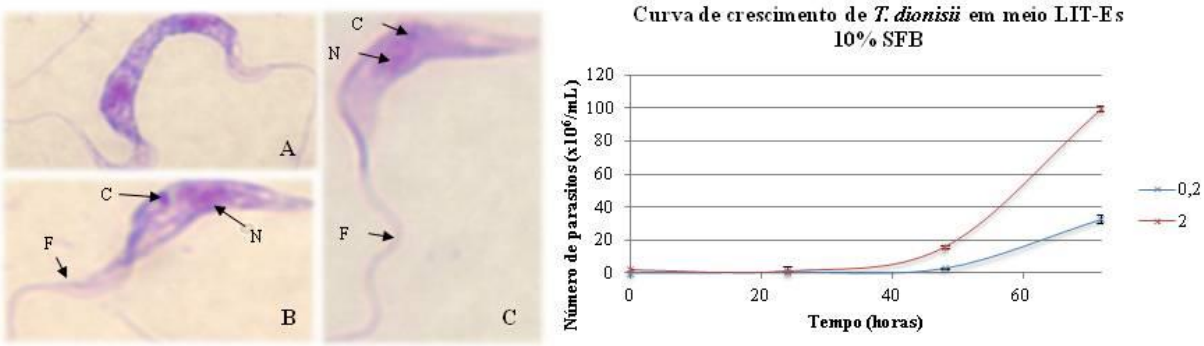


Figura 24: Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. dionisii*. As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: em divisão; B: em fase exponencial; C: em fase estacionária; C: cinetoplasto; N: núcleo; F: flagelo. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 0,2 x 10^6 e 2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.1.4 *Trypanosoma cruzi marinkellei*

A cepa de *T. c. marinkellei* investigada foi a TCC 344, proveniente de morcego coletado em Monte Negro (RO), e cedida pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP). A forma epimastigota foi cultivada em meio TC100 (Vitrocell Embriolife) 10% SFB a 28 °C. Na cultura, os parasitos formam rosetas dispersas. Na Figura 25 mostra-se o aspecto dos parasitos em fase exponencial de crescimento e as curvas de crescimento obtidas com inóculos iniciais de 1 x 10^6 e de 2 x 10^6 parasitos/mL. Na Tabela 16 constam os valores do TG das duas culturas.

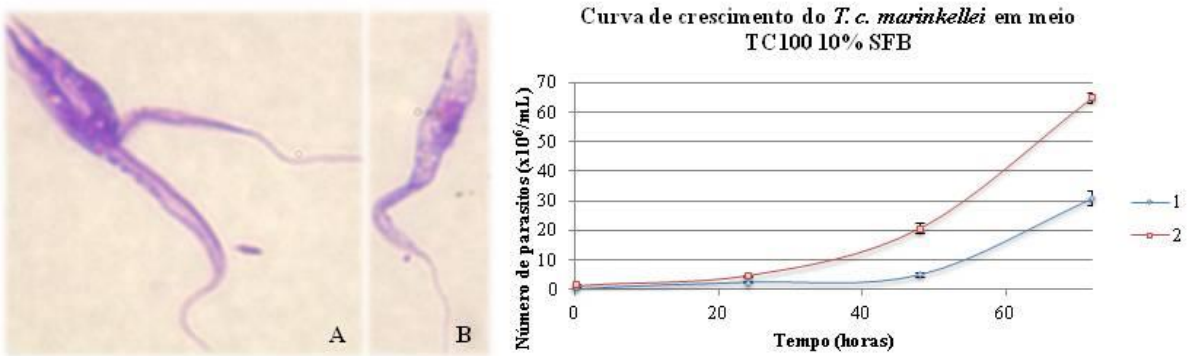


Figura 25: Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. c. marinkellei*. As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: em divisão; B: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio TC100 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 1 x 10^6 e 2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.1.5 *Trypanosoma brucei brucei*

T. brucei foi dividido em três subespécies: *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*. A primeira subespécie é parasito de vertebrados não humanos, e raramente pode infectar humanos, ao contrário das outras duas subespécies que causam patologias no homem.

Foi escolhido o isolado de *T. b. brucei* 427 Lister, cedido pelo Prof. D.r Sérgio Schenkman (UNIFESP). A forma procíclica foi mantida em fase exponencial de crescimento em meio SDM-79 (LGC Biotecnologia) 10% SFB a 28 °C. A Figura 26 (A e B) mostra o aspecto dos parasitos e as curvas de crescimento obtidas com inóculos iniciais de 0,5 x 10^6 e de 1 x 10^6 parasitos/mL. Na Tabela 16 constam os valores do TG das duas culturas.

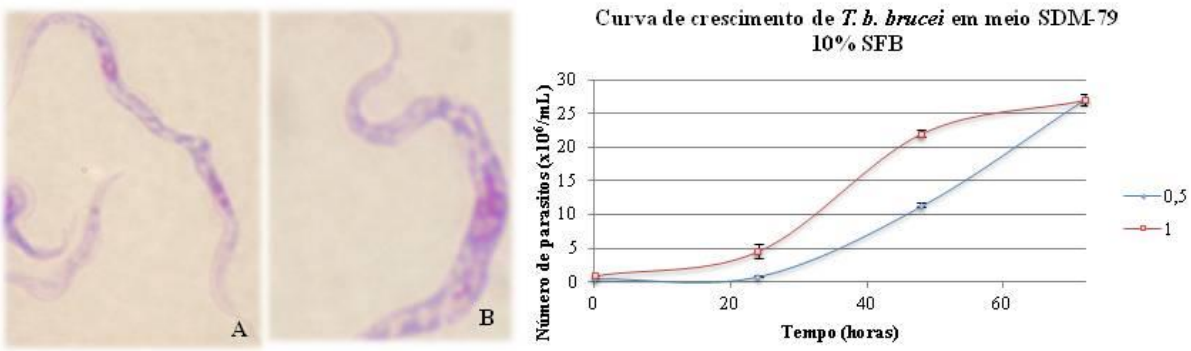


Figura 26: Registro fotográfico e curva de crescimento do *T. b. brucei*. As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: em divisão; B: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio SDM-79 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 0,5 x 10^6 e 1 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.2 Gêneros Crithidia, Angomonas e Strigomonas

Crithidia é um dos gêneros que apresenta espécies endossimbiontes. Anteriormente, esse gênero incluía os atuais gêneros *Angomonas* e *Strigomonas*. Mais recentemente, o gênero *Angomonas* foi distinguido de *Crithidia*, com base em diferenças na posição do cinetoplasto. Posteriormente, análises filogenéticas baseadas em sequências do SSU rRNA, gGAPDH e ITS1 rDNA distinguiram os gêneros *Crithidia*, *Angomonas* e *Strigomonas* (TEIXEIRA et al. 2011).

As culturas de *C. fasciculata* (TCC 039 E), *A. deanei* (TCC 036 E) e *S. galati* (TCC 219), foram cedidas pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP). Todos os isolados

foram obtidos de insetos. Os parasitos foram cultivados em meio LIT-Es 10% de SFB em BOD a 28 °C, mantendo a forma coanomastigota ou de flagelados polimórficos. Estes parasitos formam rosetas aderidas às paredes da garrafa na qual são cultivados, e, quando dispersos no meio, se movimentam rapidamente.

4.4.1.2.1 *Crithidia fasciculata*

Na Figura 27 mostra-se o aspecto do parasito e das rosetas e as curvas de crescimento obtidas com inóculos iniciais de 0,1 x 10^6 e de 0,2 x 10^6 parasitos/mL. Os TGs de ambas as culturas são apresentados na Tabela 16.

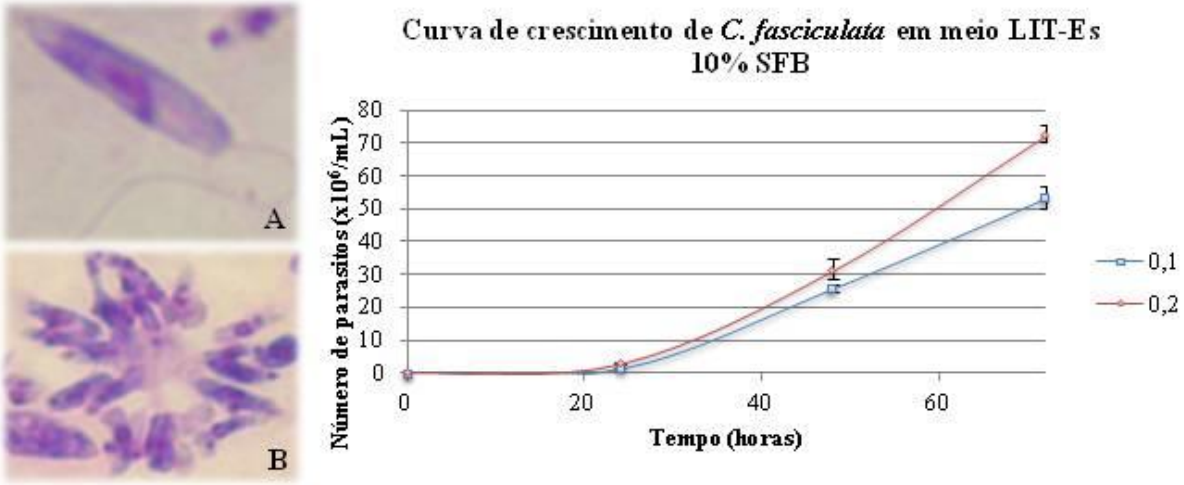


Figura 27: Registro fotográfico e curva de crescimento de *C. fasciculata.* As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: em fase exponencial; B: roseta. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 0,1 x 10^6 e 0,2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.2.2 *Angomonas deanei*

Na Figura 28 apresenta-se a morfologia dos parasitos e as curvas de crescimento obtidas a partir de inóculos de 0,1 x 10^6 e de 0,2 x 10^6 parasitos/mL. Os TGs das duas culturas são apresentados na Tabela 16.

Figura 28: Registro fotográfico e curva de crescimento de *A. deanei.* As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: em divisão; B: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 0,1 x 10^6 e 0,2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.2.3 *Strigomonas galati*

A morfologia dos parasitos de *S. galati* é apresentada na Figura 29, juntamente com as curvas de crescimento a partir de 0,2 x 10^6 e de 1 x 10^6 parasitos/mL. Nota-se que a velocidade de crescimento da cultura com inóculo inicial de 1 x 10^6 parasitos/mL diminui após 48h. Os TGs das culturas na fase exponencial de crescimento constam na Tabela 16.

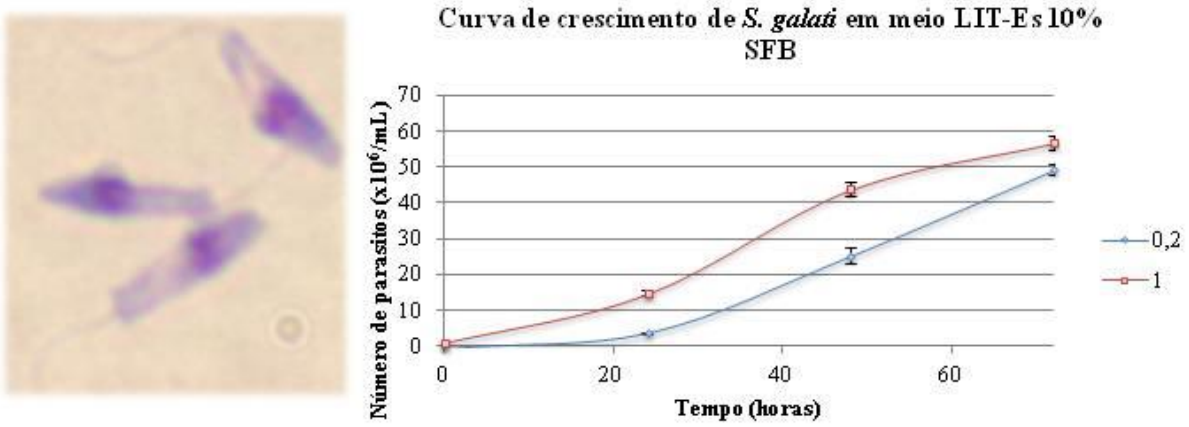


Figura 29: Registro fotográfico e curva de crescimento de *S. galati.* A lâmina foi corada com Giemsa. Aumento de 1 000x. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial 0,2 x 10^6 e 1 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.3 Gênero Leishmania

O gênero *Leishmania* inclui parasitos causadores das leishmanioses. O gênero é dimórfico, possuindo duas formas principais, a amastigota intracelular e a promastigota flagelada. O ciclo de vida é heteroxênico com um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. As diferentes espécies são transmitidas por insetos do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Seus hospedeiros primários são mamíferos e répteis.

O gênero está dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia.* Nesse estudo foi avaliada a sensibilidade a BZ em duas espécies patogênicas para o homem: *L. (L.) infantum* (LD/1972/WT), que causa lesões viscerais (calazar) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), que causa lesões cutâneas e em mucosas. As culturas foram cedidas pela Prof.a D.ra Silvia Uliana (ICB-USP). A forma promastigota dos parasitos foi cultivada a 25 °C em meio M199 10% de SFB e 2% urina masculina filtrada. Os parasitos apresentam características de crescimento diferentes, por exemplo, a cultura de *L. (V.) braziliensis*, mesmo em fase exponencial, forma rosetas dispersas no meio, ao contrário da cultura de *L. (L.) infantum* que forma rosetas, também dispersas, mas apenas quando está em fase estacionária.

Também foi investigada a sensibilidade a BZ em *L. (L.) enriettii* (TCC 2753), isolado de um porquinho-da-índia, que aparentemente não causa lesões em humanos, e em *L. (L.) tarentolae* (TCC 017 E), parasito isolado de lagarto que não é considerado patogênico para o homem. Essas culturas foram cedidas pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP) e mantidas em meio LIT-Es 10% SFB; *L. (L.) enriettii* a 25 °C e *L. (L.) tarentolae* a 28 °C.

4.4.1.3.1 *Leishmania (L.) infantum*

Na Figura 30 constam os registros fotográficos do parasito e as curvas de crescimento para inóculos iniciais de 10^6 e de 10^7 parasitos/mL. Os valores do TG das culturas são apresentados na Tabela 16.

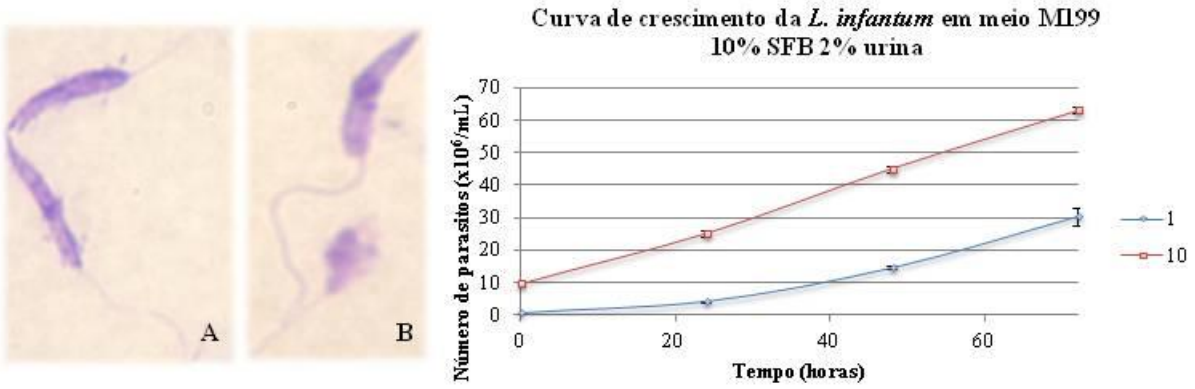


Figura 30: Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (L.) infantum*. As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos A: em divisão; B: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio M199 10% SFB 2% urina a 25 °C. Inóculo inicial: 1 x 10^6 e 10 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.3.2 *Leishmania (V.) braziliensis*

Na Figura 31 constam as imagens dos parasitos e as curvas de crescimento a partir de inóculos de 1 x10^6 e de 10 x10^6 parasitos/mL. Os valores do TG das culturas são apresentados na Tabela 16.

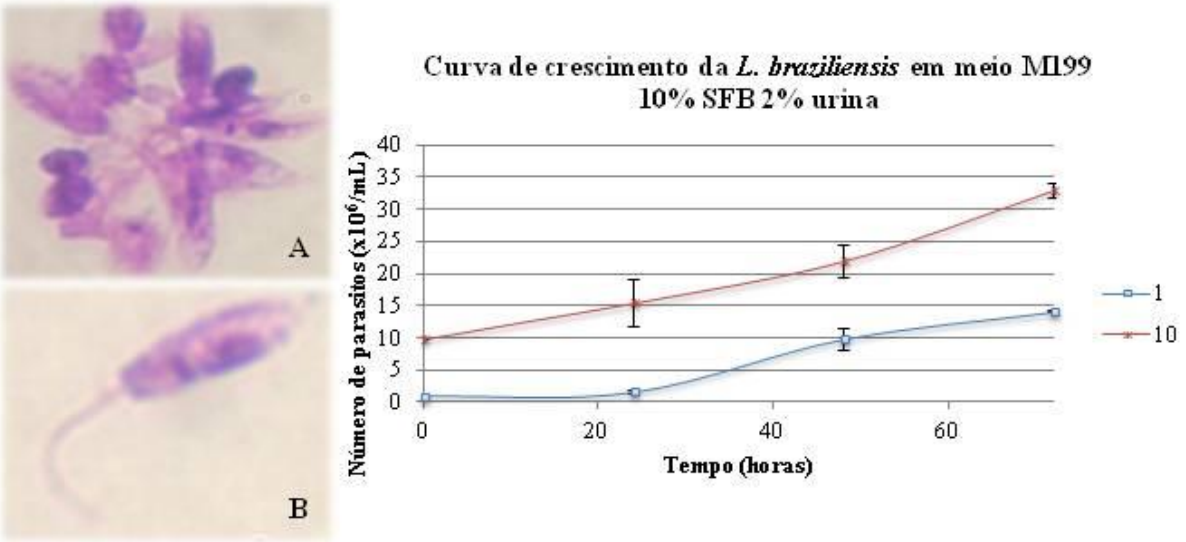


Figura 31: Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (V.) braziliensis*. As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: roseta; B: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio M199 10% SFB 2% urina a 25 °C. Inóculo inicial: 1 x 10^6 e 10 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.3.3 *Leishmania (L.) tarentolae*

Na Figura 32 constam as imagens dos parasitos e as curvas de crescimento a partir de inóculos de 0,2 x 10^6 e de 2 x 10^6 parasitos/mL. Na Tabela 16 constam os valores do TG.

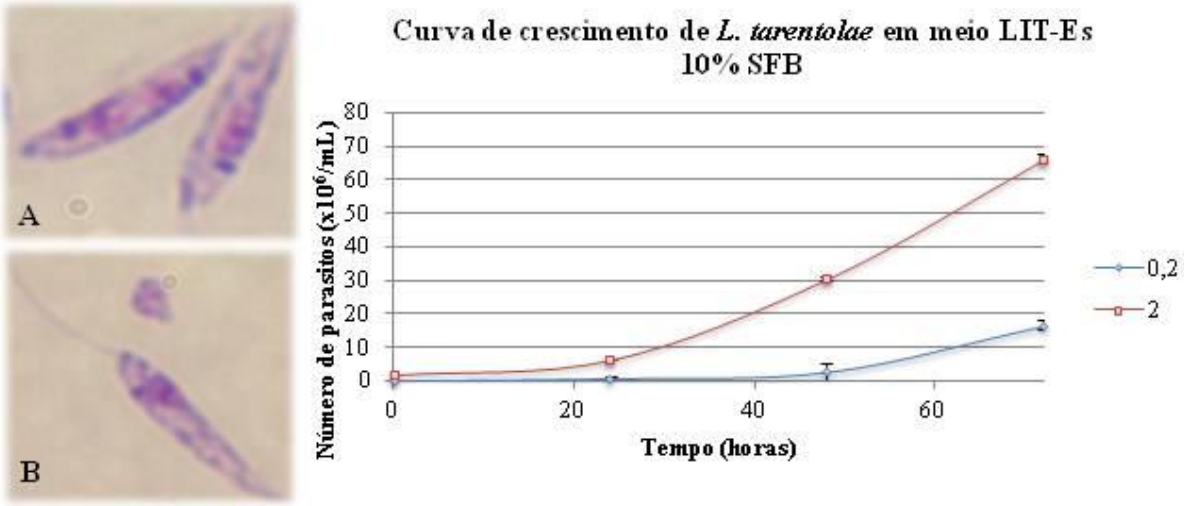


Figura 32: Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (L.) tarentolae.* As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos A e B em fase exponencial. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial: 0,2 x 10^6 e 2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.3.4 *Leishmania (L.) enriettii*

Na Figura 33 constam as imagens dos parasitos e as curvas de crescimento a partir de inóculos de 0,2 x 10^6 e de 2 x 10^6 parasitos/mL. Os valores dos TGs são apresentados na Tabela 16.

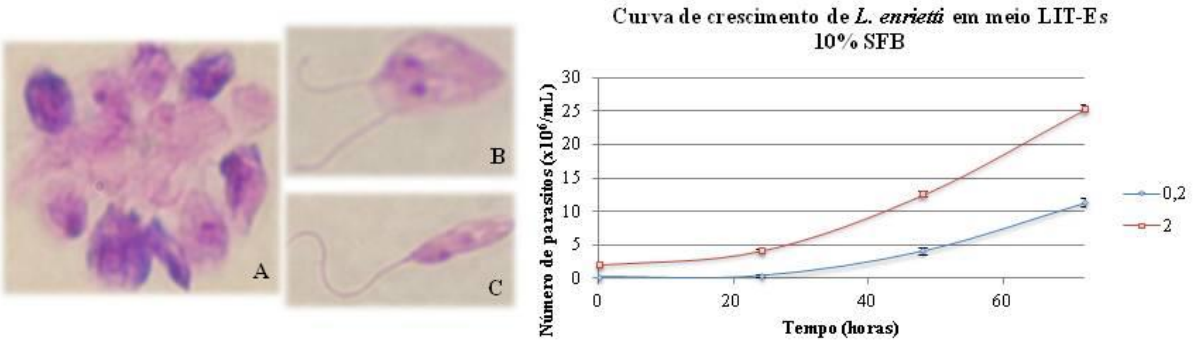


Figura 33: Registro fotográfico e curva de crescimento de *L. (L.) enriettii.* As lâminas foram coradas com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos A: roseta; B: em divisão; C: em fase exponencial. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial: 0,2 x 10^6 e 2 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.4 Gênero Phytomonas

Os tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* são parasitos de plantas, e podem ser encontrados no látex, floema, frutos e albúmen de sementes em diversas famílias de vegetais que apresentam ampla distribuição geográfica. Nestes estudos foi utilizada a cultura de *P. serpens* (TCC 060 E) isolada de tomate e fornecida pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP). A forma promastigota do parasito foi cultivada em meio LIT-Es 10% de SFB a 28 °C.

4.4.1.4.1 *Phytomonas serpens*

A morfologia da forma promastigota é mostrada na Figura 34, juntamente com as curvas de crescimento obtidas a partir de inóculos de 0,2 x 10^6 e de 1 x 10^6 parasitos/mL. Observa-se que a velocidade de crescimento da cultura iniciada a partir de 1 x 10^6 parasitos/mL diminui após 48h de incubação e que a cultura iniciada com inóculo de 0,2 x 10^6 parasitos/mL apresenta uma fase lag inicial de cerca de 48h. Os TGs das culturas na fase exponencial de crescimento são apresentados na Tabela 16.

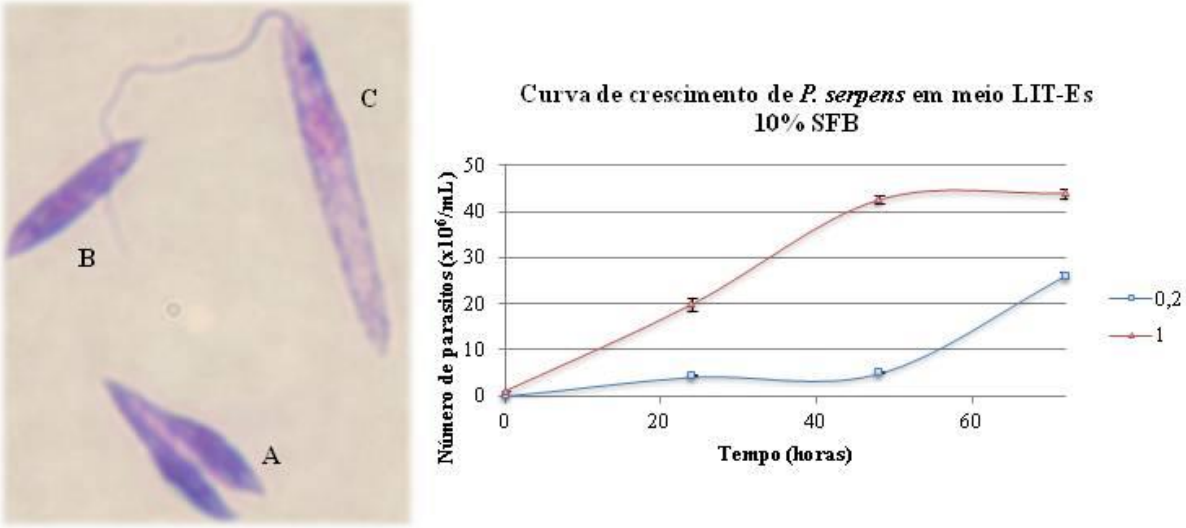


Figura 34: Registro fotográfico e curva de crescimento de *P. serpens.* A lâmina foi corada com Giemsa. Aumento de 1 000x. Parasitos, A: em divisão; B: em fase exponencial; C: forma alongada comum na fase estacionária. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 0,2 x 10^6 e 1 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.5 Gênero Paratrypanosoma

Em 2013 foi relatada a descoberta de um novo tripanossomatídeo de inseto, isolado do tubo digestivo do mosquito *Culex pipiens,* que foi denominado *Paratrypanosoma confusum* (FLEGONTOV et al. 2013). Filogenias baseadas no gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e SSU rRNA mostram que este parasito representa um ramo distinto entre o tripanossomatídeo de vida livre *Bodo saltans* e os clados de parasitos obrigatórios representados pelo gênero *Trypanosoma* e os demais tripanossomatídeos. O genoma deste organismo foi sequenciado e está sendo montado.

4.4.1.5.1 *Paratrypanosoma* sp.

Foi investigada a sensibilidade a BZ em *Paratrypanosoma* sp., isolado da espécie de percevejo *Ricolla* sp., coletada no Parque Nacional da Soberania, na cidade de Panamá, cedido pela Prof.a D.ra Marta Teixeira (ICB-USP). Os parasitos foram cultivados em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. A morfologia da forma promastigota é mostrada na Figura 35, juntamente com as curvas de crescimento obtidas a partir de inóculos de 0,1 e 1 x 10^6 parasitos/mL. Os TGs das culturas na fase exponencial de crescimento são apresentados na

Tabela 16. Quando inóculos com maior concentração de organismos foram utilizados, verificou-se intensa aglutinação dos mesmos e adesão à superfície da garrafa de plástico.

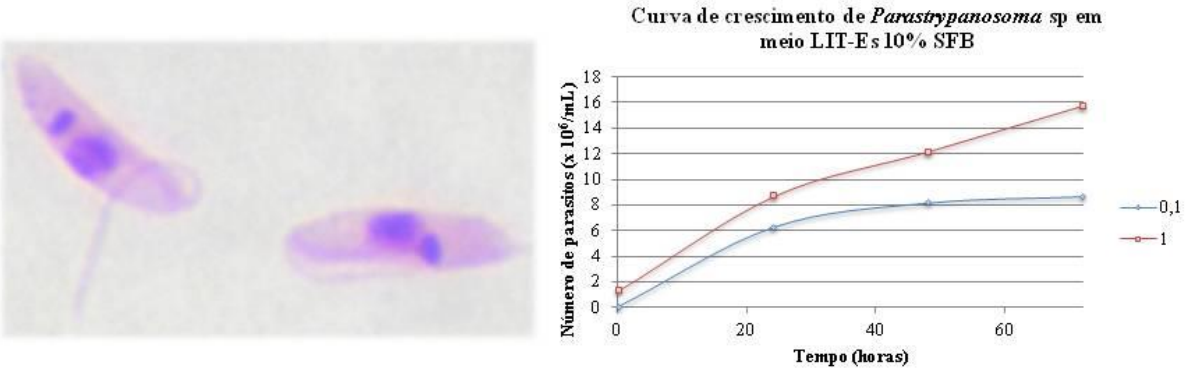


Figura 35: Registro fotográfico e curva de crescimento de *Paratrypanosoma* sp. A lâmina foi corada com Giemsa. Aumento de 1 000x. Culturas mantidas em meio LIT-Es 10% SFB a 28 °C. Inóculo inicial de 0,1 e 1 x 10^6 parasitos/mL.

4.4.1.6 Resumo das condições de cultivo e valor dos tempos de geração dos tripanossomatídeos

Na Tabela 16 apresenta-se o resumo das condições de cultivo e os valores do TG determinado na fase exponencial de crescimento das culturas.

Tabela 16: Meio de cultura e tempo de geração dos parasitos escolhidos no estudo.

Espécie – cepa/isolado	Meio de Cultura	Inóculo (x 10^6 parasitos/mL)[a]	
		Tempo de geração (horas)	
T. cruzi - *Silvio* X10.cl1	LIT-He	10	
		24,5	
T. cruzi - *Colombiana*	LIT-He	10	
		24,2	
T. rangeli - TCC086 AM80	LIT-Es	1	2
		27,6	16,3
T. dionisii - TCC 211	LIT-Es	0,2	2
		7,0	9,1
T. c. marinkellei - TCC 344	TC100	1	2
		9,2	14,6
T. b. brucei - 427	SDM-79	0,5	1
		19,0	10,9
C. fasciculata - TCC 039 E	LIT-Es	0,1	0,2
		23,3	19,9
A. deanei - TCC 036 E	LIT-Es	0,1	0,2
		21,8	16,7
S. galati - TCC 219	LIT-Es	0,2	1
		24,9	15,3
L. (L.) infantum - LD/1972/WT	M199	1	10
		22,6	36,3
L. (V.) braziliensis - MHOM/BR/1975/M2903	M199	1	10
		46,8	41,0
L. (L.) tarentolae - TCC 017 E	LIT-Es	0,2	2
		15,6	21,6
L. (L.) enriettii - TCC 2753	LIT-Es	0,2	2
		16,4	23,6
P. serpens - TCC 060 E	LIT-Es	0,2	1
		14,4	22,0
Paratrypanosoma sp. - TCC 2913	LIT-Es	0,1	1
		63,8	49,8

[a] O tempo de geração foi calculado na fase exponencial de crescimento em culturas com diferentes concentrações de inóculo inicial.

O conjunto de dados mostra elevada heterogeneidade no comportamento das culturas dos organismos selecionados para o estudo. Alguns organismos apresentam crescimento muito acelerado, o que determina utilizar inóculos iniciais com baixa concentração de parasitos para que, no tempo fixado de 72h, que será utilizado para avaliar a sensibilidade a BZ (ver item ***4.3.2***), os organismos ainda estejam em fase exponencial de crescimento. Deve ser salientado que a sensibilidade a BZ será avaliada a partir dos valores da CI_{50}, que reflete a concentração do composto que inibe 50% do crescimento da cultura, em

relação a um controle incubado em ausência do composto. Desta forma, para cada parasito foi escolhida a concentração de inóculo inicial que proporciona um crescimento exponencial no período de observação.

4.4.2 Sensibilidade a BZ

4.4.2.1 Escolha das condições de ensaio para avaliar a sensibilidade a BZ

Algumas abordagens metodológicas estão disponíveis para avaliar a sensibilidade de organismos a compostos. Inicialmente, foi avaliado se o método da variação da turbidez da cultura (ver Subprojeto 1) poderia ser utilizado para monitorar a sensibilidade ao BZ de cepas de *T. cruzi* e de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*. Para isto, determinou-se o comprimento de onda ideal dos meios de cultivo de cada parasito com a abordagem descrita no Subprojeto 1. Verificou-se que, para o meio utilizado para *Leishmania* (M199 10% SFB + 2% urina masculina), o comprimento de onda ideal foi de 585 nm (48,9% de transmitância) e, para o meio LIT-He 10% SFB, 474 nm (49,3% de transmitância).

Em seguida, foi determinada a correlação entre o número de parasitos e a absorbância do meio (Figura 36). Verificou-se uma boa linearidade de resposta (Tabela 17).

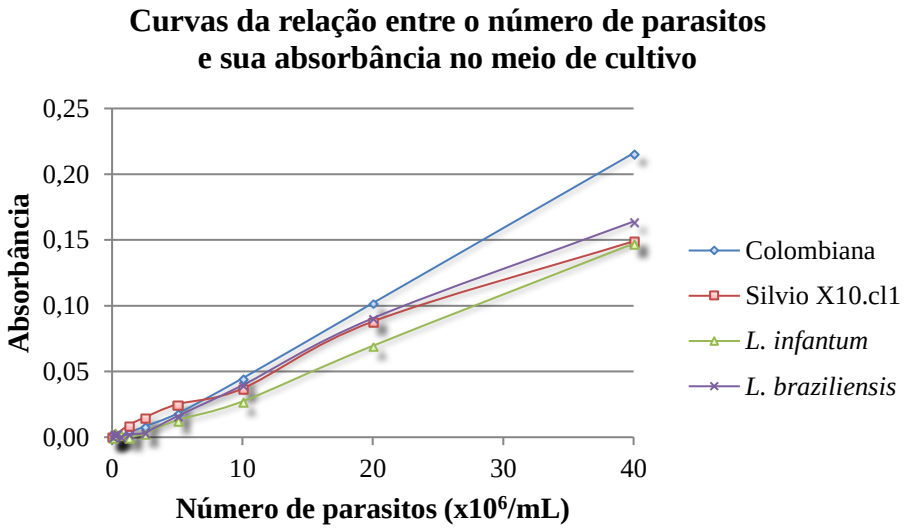


Figura 36: Relação entre a concentração de parasitos e a absorbância do meio de cultura. Curva obtida com o leitor de ELISA (Epoch da BioTek Instruments) em meio M199 10% SFB 2% urina (585 nm) para *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* e meio LIT-He 10% SFB (492 nm) para as cepas Silvio X10.cl1 e Colombiana de *T. cruzi.*

Outra abordagem utilizada para aferir a sensibilidade a fármacos emprega o ensaio do MTT, que monitora, indiretamente, o número de parasitos viáveis. Para validar este método, foi aplicado o ensaio do MTT, descrito no item *4.2.2.2*, a diferentes concentrações de formas epimastigotas da cepa Silvio X10.cl1 vivas e mortas pelo calor (incubação a 56 °C por 30min) (Figura 37). Os dados comprovam que parasitos mortos não produzem formazan. A equação da reta mostra uma regressão linear entre o número de parasitos vivos e a absorbância do formazan produzido no ensaio.

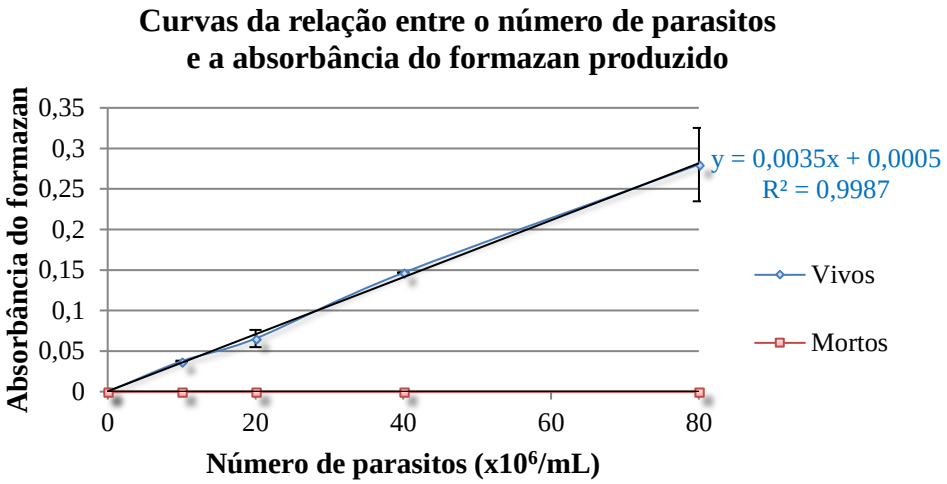


Figura 37: Produção de formazan por epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Silvio X10.cl1) vivos e mortos pelo calor. A absorbância do formazan foi determinada a 590 nm. A equação da reta indica a correlação entre o número de parasitos e a absorbância do formazan.

Tendo em vista que na cultura de vários tripanossomatídeos ocorre a formação de rosetas (ver item ***4.4.1)***, o que inviabilizaria o uso do método da variação da turbidez da cultura, optou-se por utilizar o ensaio do MTT para avaliar a sensibilidade a BZ dos diversos organismos.

4.4.2.2 Padronização do ensaio do MTT para cada espécie de tripanossomatídeo

Para cada parasito, foi determinada a correlação entre a concentração de organismos vivos e a produção de formazan no ensaio do MTT. Optou-se por apresentar todas as curvas no APÊNDICE C, e mostrar as equações das retas determinadas nos ensaios (Tabela 17). Calculou-se também o valor do coeficiente de determinação R^2, que indica quanto da

variação total é comum aos elementos que constituem os pares analisados. Este valor está no intervalo [0, 1]. A reta de regressão é um modelo perfeito quando $R^2 = 1$. Foi verificado que para um grande número de organismos analisados o valor de R^2 é maior que 0,99.

Tabela 17: Equação da reta que correlaciona o número de parasitos e a absorbância do formazan produzido no ensaio do MTT.

Espécie – cepa/isolado	Equação da reta[a]	R^{2b}
T. cruzi - *Silvio* X10.cl1	y = 0,0035x + 0,0005	0,9987
T. cruzi - *Colombiana*	y = 0,0055x + 0,0131	0,9951
T. rangeli - TCC086 AM80	y = 0,0103x + 0,0280	0,9569
T. dionisii - TCC 211	y = 0,0085x - 0,0022	0,9992
T. c. marinkellei - TCC 344	y = 0,0118x - 0,0031	0,9981
T. b. brucei - 427	y = 0,0281x + 0,0048	0,9951
C. fasciculata - TCC 039 E	y = 0,0085x + 0,0474	0,9637
A. deanei - TCC 036 E	y = 0,0035x + 0,0235	0,9520
S. galati - TCC 219	y = 0,0019x + 0,0221	0,9360
L. (L.) infantum - LD/1972/WT	y = 0,0128x + 0,2616	0,8631
L. (V.) braziliensis - MHOM/BR/1975/M2903	y = 0,0125x + 0,2325	0,8117
L. (L.) tarentolae - TCC 017 E	y = 0,0061x + 0,0327	0,9676
L. (L.) enriettii - TCC 2753	y = 0,0120x - 0,0110	0,9678
P. serpens - TCC 060 E	y = 0,0067x + 0,0176	0,9941
Paratrypanosoma sp. - TCC 2913	y = 0,0212x + 0,0043	0,9955

[a] Calculada no programa do Excel.
[b] R^2 é o coeficiente de determinação.

4.4.2.3 Determinação da CI_{50} para BZ

A sensibilidade para BZ foi determinada após um período de incubação de 72h, ajustando-se o tamanho do inóculo para que a cultura estivesse em fase exponencial de crescimento até o final do ensaio. A concentração de BZ variou de 0 a 80 µM para alguns parasitos, e de 0 a 160 µM, para outros, conforme especificado a seguir. Foram feitas três réplicas biológicas e duas técnicas para cada amostra. Para organismos sensíveis a BZ (ver a

seguir), as curvas de inibição do crescimento e os valores de CI_{50} foram obtidos utilizando o programa *OriginPro8.0* (versão 8.0. SR00 - Trial, OriginLab Corporation: Northampton, MA, EUA, 2007, licença institucional).

Para facilitar a compreensão, nos itens seguintes, a sensibilidade a BZ será avaliada em grupos de parasitos.

4.4.2.3.1 Gênero *Trypanosoma*

O efeito de concentrações de BZ sobre o crescimento de diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* é resumido na Figura 38. A maior parte dos parasitos apresenta inibição do crescimento a partir de 1,25 µM de BZ, com exceção de *T. dionisii* que é altamente resistente e que, na concentração de 160 µM, apresenta uma inibição de crescimento de apenas 18%.

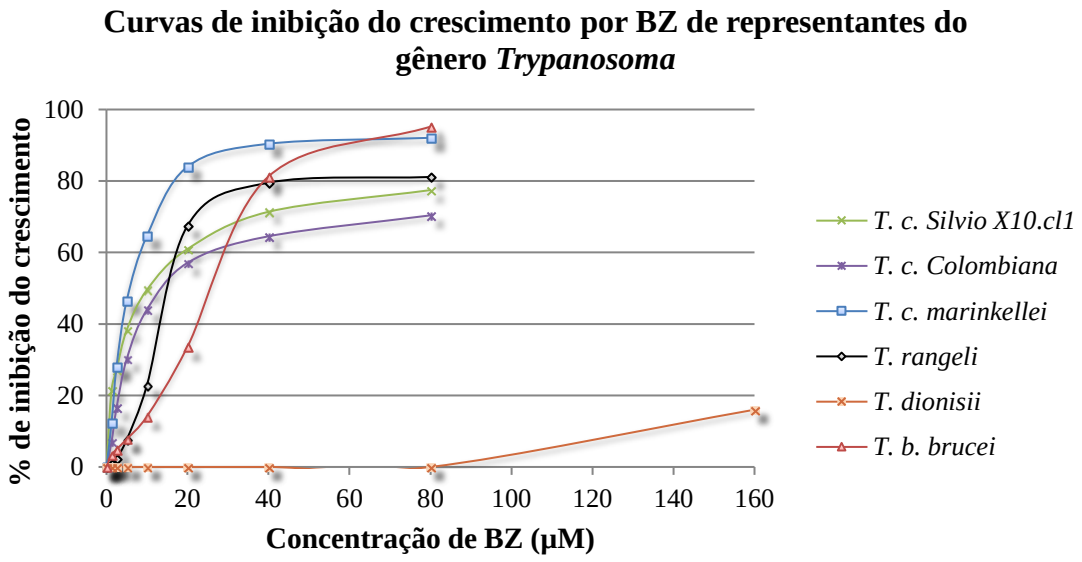
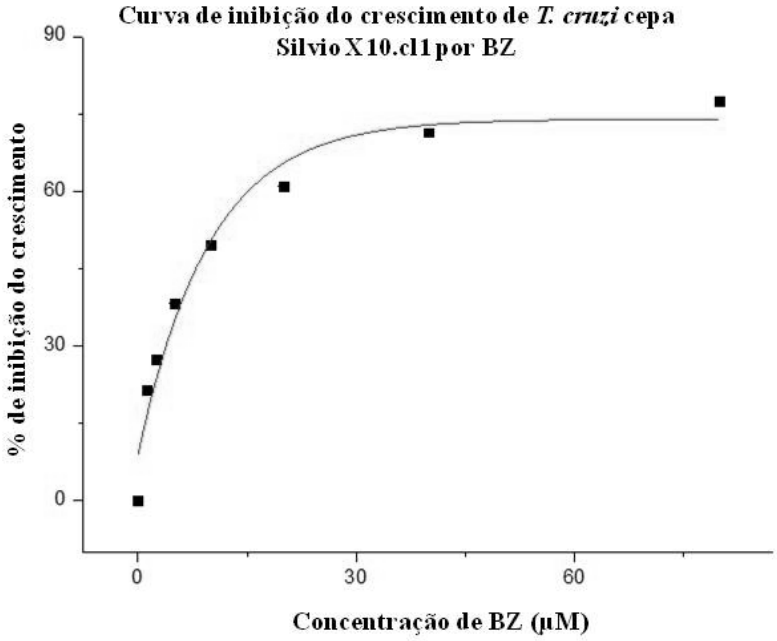


Figura 38: Curva de inibição do crescimento de espécies do gênero *Trypanosoma* por BZ.

A seguir, foram apresentadas as curvas de inibição do crescimento e as CI_{50} de BZ para as cepas de *T. cruzi* Silvio X10.cl1 (Figura 39) e Colombiana (Figura 40); para *T. c. marinkellei* (Figura 41); para *T. rangeli* (Figura 42); e para *T. b. brucei* (Figura 43). Os valores são resumidos na Tabela 19.

Chama a atenção o fato de que as curvas de inibição dose-resposta de *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* têm um formato semi-logarítmico, ao passo que as curvas de inibição de *T.*

rangeli e T. b. brucei têm um formato sigmoidal, sugerindo que *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* tenham maior sensibilidade a BZ do que *T. rangeli* e *T. b. brucei*. Isto pode ser comprovado a partir dos valores de CI_{50} determinados para as várias espécies (ver também Tabela 19).

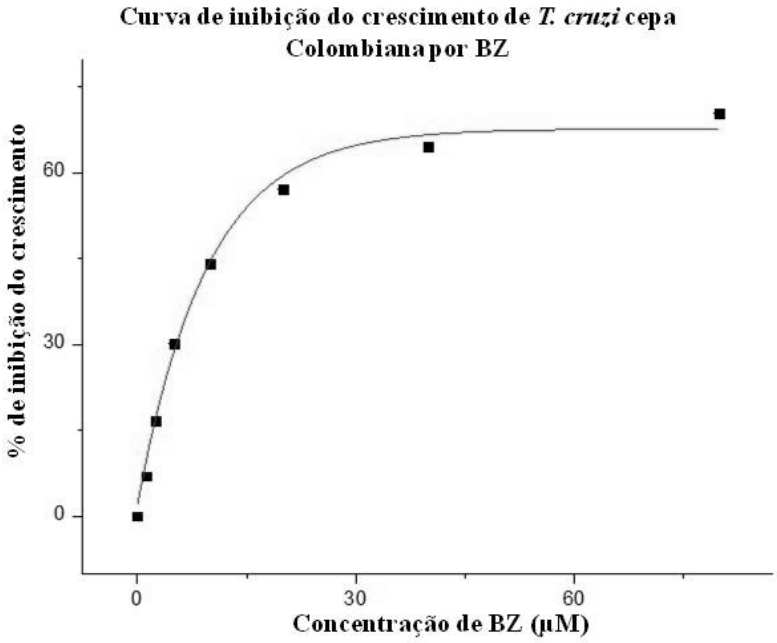


Dados de inibição do crescimento da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* por BZ.

Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,202	± 0,004	0,00
1,25	0,159	± 0,024	21,44
2,5	0,147	± 0,009	27,26
5	0,125	± 0,002	38,29
10	0,102	± 0,002	49,57
20	0,079	± 0,002	60,97
40	0,058	± 0,003	71,38
80	0,046	± 0,002	77,45

CI_{50} ± dp: 9,56 ± 1,04 µM

Figura 39: Inibição do crescimento da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* por BZ.

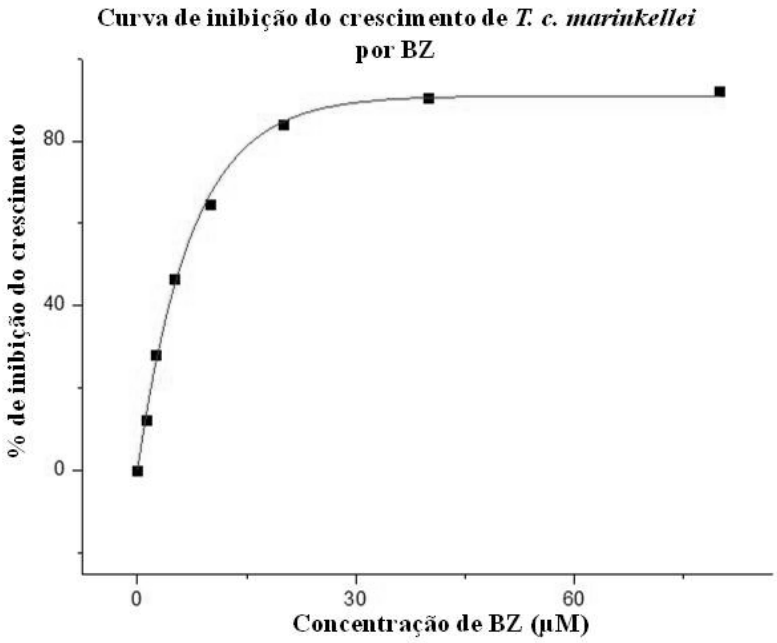


Dados de inibição do crescimento da cepa Colombiana de *T. cruzi* por BZ.

Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,000	± 0,005	0
1,25	0,222	± 0,003	6,98
2,5	0,207	± 0,005	16,55
5	0,185	± 0,001	30,18
10	0,155	± 0,003	44,03
20	0,124	± 0,002	57,09
40	0,095	± 0,004	64,53
80	0,079	± 0,002	70,38

CI_{50} ± dp: 13,62 ± 1,21 µM

Figura 40: Inibição do crescimento da cepa Colombiana de *T. cruzi* por BZ.

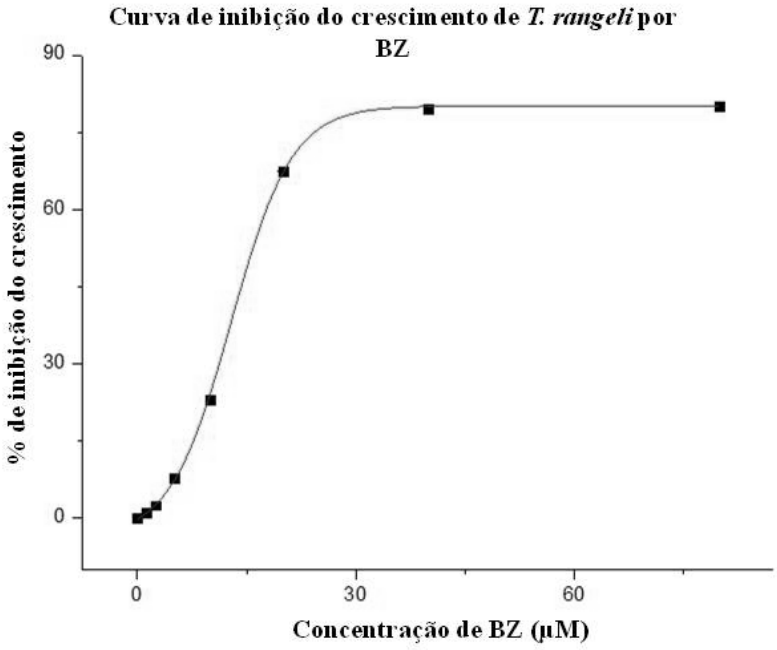


Dados de inibição do crescimento de *T. c. marinkellei* por BZ.

Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,164	± 0,004	0
1,25	0,144	± 0,006	12,28
2,5	0,118	± 0,005	28,11
5	0,088	± 0,012	46,54
10	0,058	± 0,003	64,67
20	0,026	± 0,003	83,98
40	0,016	± 0,006	90,41
80	0,013	± 0,002	92,08

CI_{50} ± dp: 3,56 ± 1,45 µM

Figura 41: Inibição do crescimento de *T. c. marinkellei* por BZ.

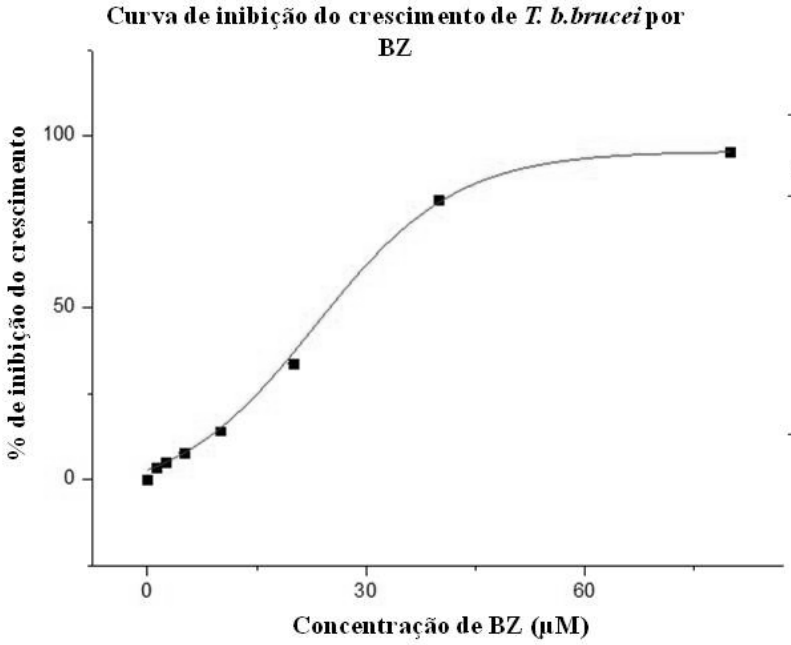


Dados de inibição do crescimento de *T. rangeli* por BZ.

Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,062	± 0,004	0
1,25	0,062	± 0,001	0,96
2,5	0,061	± 0,001	2,41
5	0,058	± 0,002	7,63
10	0,048	± 0,005	22,89
20	0,020	± 0,004	67,47
40	0,013	± 0,006	79,52
80	0,012	± 0,001	81,12

CI_{50} ± dp: 12,71 ± 1,04 µM

Figura 42: Inibição do crescimento de *T. rangeli* por BZ.



Dados de inibição do crescimento de *T. b. brucei* por BZ.

Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,798	± 0,082	0
1,25	0,772	± 0,007	3,35
2,5	0,759	± 0,003	4,95
5	0,736	± 0,003	7,79
10	0,685	± 0,022	14,16
20	0,530	± 0,037	33,60
40	0,150	± 0,020	81,24
80	0,038	± 0,006	95,21

CI_{50} ± dp: 25,48 ± 1,08 µM

Figura 43: Inibição do crescimento de *T. b. brucei* por BZ.

4.4.2.3.2 Gêneros *Crithidia*, *Angomonas* e *Strigomonas*

Os parasitos dos gêneros *Crithidia*, *Angomonas* e *Strigomonas* apresentaram inibição do crescimento em concentrações maiores do que 40 µM de BZ (Figura 44). Na maior concentração de BZ utilizada (160 µM), a inibição do crescimento foi cerca de 20%, sendo, esses parasitos considerados resistentes a BZ.

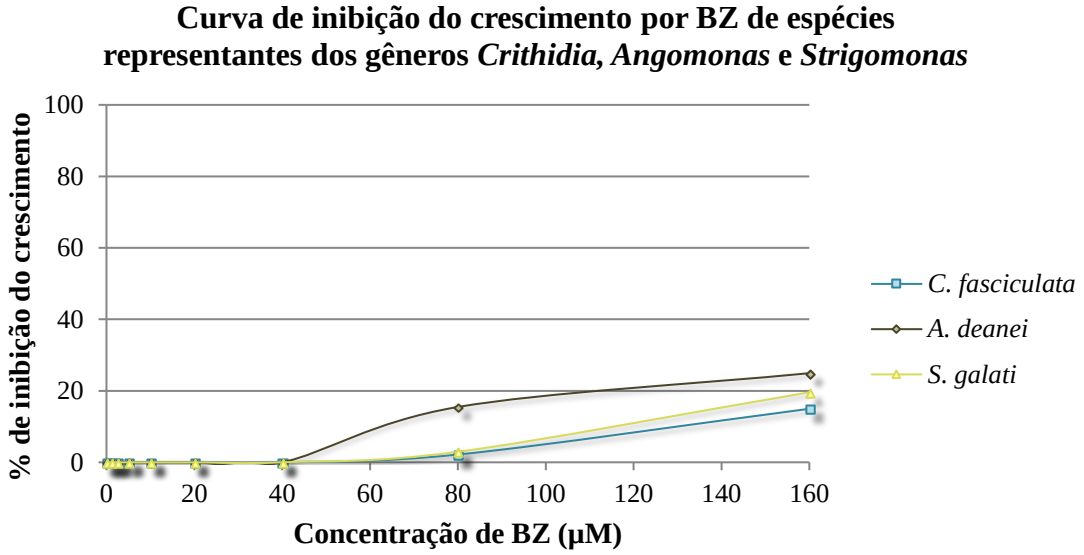


Figura 44: Inibição do crescimento de espécies dos gêneros *Crithidia*, *Angomonas* e *Strigomonas* por BZ.

4.4.2.3.3 Gênero *Leishmania*

As quatro espécies de *Leishmania* estudadas não foram sensíveis a BZ até a concentração de 40 µM (Figura 45). A partir desta concentração, BZ apresentou inibição linear do crescimento até 160 µM, a maior concentração ensaiada. Os dados da Figura 45 sugerem que as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) tarentolae* teriam sensibilidade maior a BZ que *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) enriettii*.

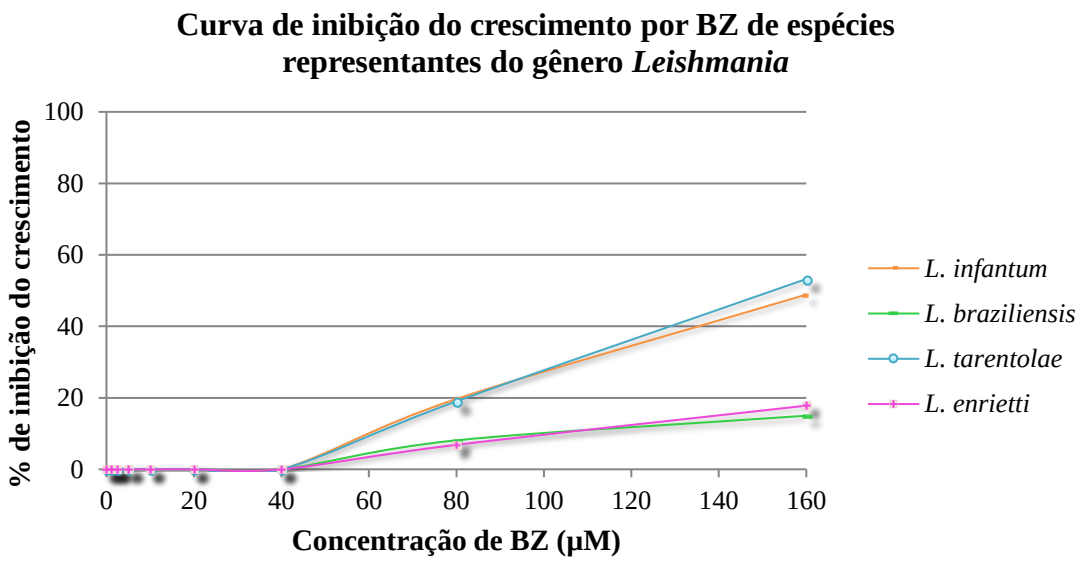


Figura 45: Inibição do crescimento de espécies do gênero *Leishmania* por BZ.

Para comprovar a validade do ensaio do MTT, foi utilizado como controle Anfotericina B (AB) (A9528 - Merck), conhecido inibidor do crescimento de formas promastigotas e amastigotas em diversas espécies do gênero *Leishmania* (ESCOBAR et al. 2002). As espécies *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* foram incubadas com duas concentrações de AB, por 72h e a inibição do crescimento foi determinada em relação a um controle em ausência do composto (Tabela 18). Verificou-se que, nas nossas condições experimentais, a concentração de 1 µM de AB promove 100% e 55% de inibição do crescimento de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente.

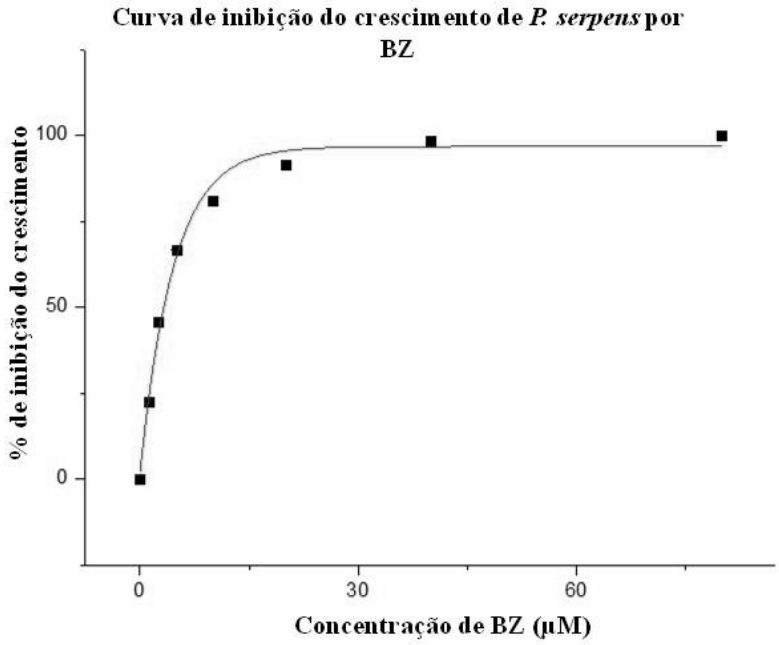
Tabela 18: Inibição do crescimento de duas espécies de *Leishmania* por Anfotericina B.

Parasitos		Controle (+)[a]	Anfotericina B (µM)	
		0	**0,3**	**1**
L. (L.) infantum	**Abs.[b]**	0,089	0,058	0
	dp[c]	0,065	0,005	0,005
	%IC[d]	--	35,39	100,00
L. (V.) braziliensis	**Abs.[b]**	0,145	0,099	0,065
	dp[c]	0,002	0,008	0,015
	%IC[d]	--	32,07	55,34

[a] C(+): controle sem adição de composto.
[b] Abs.: Média da absorbância do formazan produzido.
[c] dp: desvio-padrão.
[d] %IC: porcentagem de inibição do crescimento em relação a C(+).

4.4.2.3.4 Gênero *Phytomonas*

A cultura de *P. serpens* apresentou elevada sensibilidade ao BZ, sendo que com 80 µM do fármaco houve inibição total do crescimento (Figura 46).



Dados de inibição do crescimento de *P. serpens* por BZ.

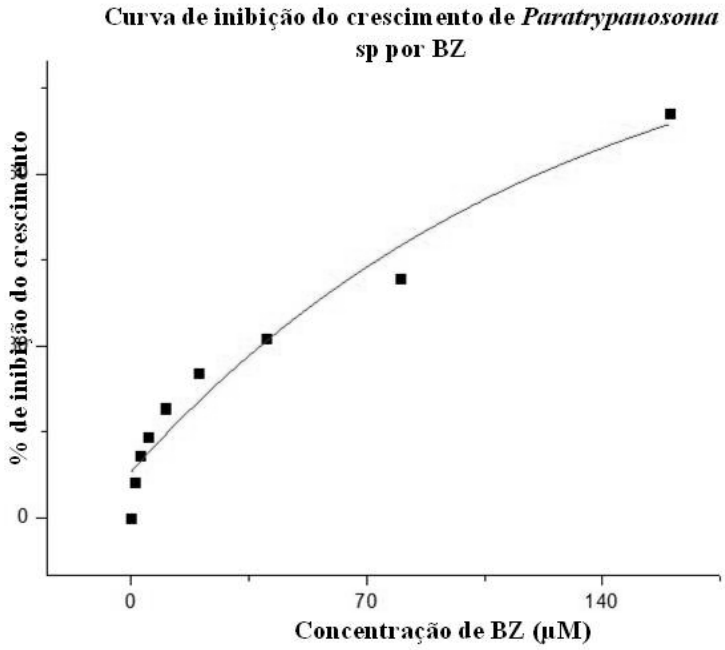
Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,066	± 0,004	0
1,25	0,051	± 0,002	22,64
2,5	0,036	± 0,002	45,66
5	0,022	± 0,002	66,79
10	0,013	± 0,002	81,13
20	0,006	± 0,003	91,32
40	0,001	± 0,002	98,49
80	0,000	± 0,003	100,00

CI_{50} ± dp: 2,77 ± 1,01 µM

Figura 46: Inibição do crescimento de *P. serpens* por BZ.

4.4.2.3.5 Gênero *Paratrypanosoma*

A curva da sensibilidade da cultura de *Paratrypanosoma* sp. (TCC 2913) a BZ é mostrada na Figura 47. Para este organismo notou-se um comportamento bastante diferente daquele observado para os demais parasitos. Na concentração de 40 µM BZ, a inibição do crescimento é de 31%, aumentando-se a concentração para 160 µM, a inibição foi de 70%. Conclui-se que *Paratrypanosoma* sp. é resistente a BZ. Com os dados disponíveis não é possível calcular o valor da CI_{50}.



Dados de inibição do crescimento de *Paratrypanosoma* por BZ.

Conc. BZ (µM)	Absorbância (λ = 590 nm) (Média ± dp)		% IC
0	0,409	± 0,052	0
1,25	0,383	± 0,028	6,20
2,5	0,364	± 0,055	10,93
5	0,351	± 0,041	14,05
10	0,331	± 0,059	19,11
20	0,305	± 0,040	25,31
40	0,281	± 0,041	31,33
80	0,238	± 0,017	41,76
160	0,120	± 0,000	70,53

Figura 47: Inibição do crescimento de *Paratrypanosoma* sp. por BZ.

4.4.2.4 Resumo dos Resultados de sensibilidade a BZ

O conjunto das curvas de inibição de crescimento dos organismos estudados, promovidas por diferentes concentrações de BZ, é mostrado na Figura 48.

É evidente a divisão dos parasitos em dois grupos: um grupo que apresenta curvas de inibição do crescimento típicas, que tendem à saturação; e um grupo que é insensível a BZ até a concentração de 40 µM e no qual a inibição aumenta linearmente até a máxima concentração ensaiada de 160 µM. *Paratrypanosoma* sp. apresenta um padrão de inibição intermediário. Para este parasito não se observa tendência à saturação. Por outro lado, o organismo apresenta uma inibição de crescimento de 30% na concentração de 40 µM de BZ.

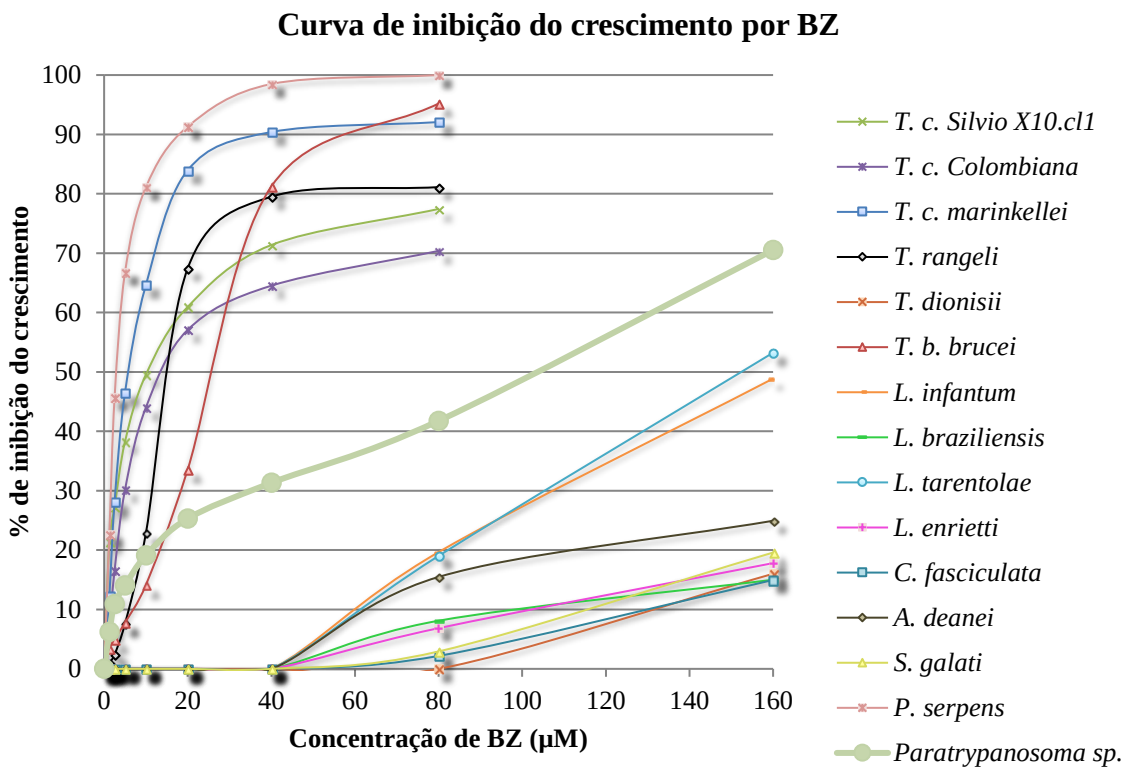


Figura 48: Curvas de inibição do crescimento dos parasitos por BZ. A viabilidade de todos os parasitos foi testada de 0 a 80 µM. Para as espécies cujo crescimento não foi inibido com 40 µM de BZ foram ensaiadas concentrações do fármaco até 160 µM.

Para o primeiro grupo de parasitos foi possível calcular os valores da CI_{50}, que são resumidos na Tabela 19.

Tabela 19: Valores de CI_{50} para BZ obtidos para parasitos que apresentaram inibição do crescimento que tende à saturação.

Gênero	Espécie	CI_{50} (µM) Media ± dp
Trypanosoma	*T. cruzi* - Silvio X10.cl1	9,56 ± 1,04
	T. cruzi - Colombiana	13,62 ± 1,21
	T. c. marinkellei	3,56 ± 1,45
	T. rangeli	12,71 ± 1,04
	T. brucei brucei	25,48 ± 1,08
Phytomonas	*P. serpens*	2,77 ± 1,01

Para o segundo grupo de parasitos, que apresentaram inibição do crescimento apenas com concentrações maiores que 40 µM de BZ, na Tabela 20 foi registrada a porcentagem de inibição do crescimento promovida por 80 e 160 de µM BZ, em relação ao controle incubado em ausência de composto. Tendo em vista a baixa sensibilidade de *Paratrypanosoma* sp. ao fármaco, foi incluída nesta tabela a porcentagem de inibição do crescimento promovida pelas duas concentrações de BZ.

Tabela 20: Porcentagem de inibição do crescimento (%IC) promovida por duas concentrações de BZ.

Espécie	**BZ (µM)**	
	80	**160**
T. dionisii	0	16,01
C. fasciculata	2,17	14,97
A. deanei	15,48	24,94
S. galati	2,93	19,58
L. (L.) infantum	19,66	48,88
L. (V.) braziliensis	8,10	15,00
L. (L.) tarentolae	19,02	53,24
L. (L.) enriettii	6,85	17,81
***Paratrypanosoma* sp.**	41,76	70,53

4.4.3 Captação de Benznidazol

Tendo em vista a resistência a BZ observada em espécies de *Leishmania*, que contrastava com a sensibilidade ao fármaco observada em espécies do gênero *Trypanosoma* (exceto *T. dionisii*), decidiu-se comparar a capacidade de captação do composto por representantes dos dois gêneros. Em bactéria, foi estabelecido um protocolo para medir a captação de compostos, baseado no monitoramento da redução da concentração dos mesmos no meio extracelular, aferida pela medida da absorbância no comprimento de onda apropriado para o composto (ZHOU et al. 2015). Protocolo análogo foi adotado por Boiani et al. (2010) para determinar a captação de NFX e de compostos heterocíclicos em *T. cruzi*. Em Materiais e Métodos foi descrito o protocolo adotado em nosso estudo.

Inicialmente, foi avaliada a estabilidade de 50 µM de BZ no meio A/G contendo 10 mg/mL de BSA, mas na ausência de parasitos. Verificou-se que até 120min de incubação a 25 °C ou 28 °C ocorre a redução de cerca de 1 nmol do composto no meio (dados não mostrados).

Em seguida, foi determinada a cinética de captação do fármaco por formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (LD/1972/WT) e por epimastigotas de *T. cruzi* (Silvio X10.cl1). Tendo em vista a resistência a BZ observada em espécies de *Leishmania*, *L. (L.) infantum,* foi incubada com 100 µM BZ (a 25 °C) e *T. cruzi* com 50 µM BZ (a 28 °C).

O desaparecimento de BZ do meio de cultura foi monitorado a 324 nm, comprimento de onda de absorbância máxima de BZ no meio de incubação. A quantidade de composto interiorizada em cada tempo foi calculada a partir da redução da absorbância do meio em relação ao valor da absorbância no tempo 0min (Tabela 21). Descontando-se o valor da degradação de BZ no meio (1 nmol), os dados indicam que *T. cruzi* interioriza 6,8 nmoles de BZ em 120min de incubação a 28 °C, ao contrário de *L. (L.) infantum* em que a interiorização de BZ é de 1,2 nmoles.

Tabela 21: Captação de BZ por *T. cruzi* e por *L. (L.) infantum*[a].

	Tempo (min)	***T. cruzi* (28 °C) BZ 50 µM**	***L. (L.) infantum* (25 °C) BZ 100 µM**
Absorbância[b]	**0**	0,44	0,50
	30	0,39	0,51
	60	0,38	0,50
	90	0,35	0,50
	120	0,34	0,48
nmoles (cumulativo)[c]	**0**	0	0
	30	3,62	-0,375
	60	4,04	0,295
	90	6,07	0,255
	120	6,83	1,267

[a] Dados de um único ensaio
[b] Determinada no meio de cultura.
[c] Quantidade de BZ interiorizada nos parasitos.

Em função da posição taxonômica de *P. serpens* e o fato de esta espécie mostrar-se sensível a BZ, embora próxima a espécies resistentes ao fármaco, também foi avaiada a capacidade de captação de BZ neste organismo. Os parasitos foram incubados com 50 µM de

BZ a 28 °C (Tabela 22). Descontando-se a degradação de BZ em ausência de parasitos, verificou-se que a taxa de captação de BZ foi igual para *T. cruzi* e *P. serpens*, cerca de 6 nmoles.

Tabela 22: Captação de BZ por *T. cruzi* e por *P. serpens* a 28 °C[a].

	Tempo (min)	***T. cruzi***	***P. serpens***
Absorbância[b]	0	0,447	0,446
	120	0,350	0,354
nmoles (cumulativo)[c]	0	0	0
	120	6,57	6,16

[a] Dados de um único ensaio
[b] Determinada no meio de cultura.
[c] Quantidade de BZ interiorizada nos parasitos.

4.4.4 Análise de sequências de marcadores potencialmente envolvidos na sensibilidade/resistência a BZ

Conforme descrito no item anterior, os ensaios de sensibilidade a BZ mostram a divisão dos tripanossomatídeos investigados em dois grupos: um grupo sensível e um grupo que apresenta resistência a baixas concentrações do fármaco. Também foi mencionado que vários estudos descrevem o potencial envolvimento das enzimas NTR, OYE e FeSOD-A e do transportador ABCG1 na resistência natural ou selecionada *in vitro* do *T. cruzi* a BZ. Desta forma, passou-se a analisar as sequências gênicas e proteicas desses marcadores para, posteriormente, realizar análises filogenéticas. Tendo em vista não estar disponível ainda a sequência final do genoma de *Paratrypanosoma*, deixou-se de analisar as sequências deste organismo.

4.4.4.1 Busca e análise das sequências da NTR, OYE, FeSOD-A e ABCG1

As sequências dos genes codificadores das proteínas anteriormente mencionadas foram resgatadas em bancos de dados públicos (GenBank e TryTripDB) e em bancos do projeto AToL especificados em Materiais e Métodos. Salienta-se que as sequências resgatadas se referem não só aos tripanossomatídeos cuja sensibilidade a BZ foi aqui determinada. As

metodologias utilizadas para as buscas, conversão da sequência gênica em sequência proteica e alinhamentos foram descritas em Materiais e Métodos.

Após análise de domínios conservados de cada proteína listados no *Conserved Domain Database* do NCBI (Tabela 23), foram eliminadas as sequências falso-positivas.

Tabela 23: Domínios conservados selecionados para cada sequência proteica.

Proteína	**Domínio selecionado**	**Sítios**
NTR	*Nitro-FMN reductase superfamily*	Sítio de ligação a FMN
OYE	*Triosephosphate isomerase (TIM) phosphate binding superfamily* *Old yellow enzyme (OYE)-like FMN*	Sítio ativo Sítio de ligação ao substrato Sítio de ligação a FMN
FeSOD-A	*Superoxide dismutase SodA* *SOD Fe C superfamily* *SOD Fe N superfamily*	
ABCG1	*PRK 10535 superfamily* *ABC ATPase superfamily* *ABC PDR domain1*	Walker A e Walker B Sítio de ligação ao ATP Assinatura ABC

Além dos domínios conservados, foram também definidos, para algumas proteínas, alguns elementos específicos, visando estabelecer uma análise comparativa entre os organismos. Sequências que não apresentassem esses elementos foram excluídas. Nas Figuras 47, 48, 49 e 50 foram mostradas a sequência e a localização dos domínios conservados e dos elementos característicos das proteínas de CL Brener.

Para a *Tc*NTR, foi tomada como referência a sequência do haplótipo Esmeraldo da cepa CL Brener (WILKINSON et al. 2008). Na Figura 49 mostra-se a localização da sequência putativa de endereçamento para a mitocôndria (PSORT: *putative mitochondrial targeting sequences*), do sítio de ligação ao FMN e do domínio *Nitro-FMN reductase superfamily*. As três regiões foram consideradas relevantes e deveriam estar presentes nas sequências resgatadas.

```
         10         20         30         40         50         60         70         80
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MRRNDIKRRL LDSLISYWRW NRENLSRNFS AFVENGRHVI GMDGPVEAGS EKDMGRGNSS MPPFFSSMPP SSSSSLPLDA

         90        100        110        120        130        140        150        160
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MKRVVHERRS CKRFDPTKSI DLDVVSDLLA MTVRAPTALN LQPWVAVVIH EEEQRETLSR AALGQPQPRD APVTVVFAGD

        170        180        190        200        210        220        230        240
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MEPESNAPAA LEMGLESGYY HSLYGAAYLR HAYYLLHGGP CEVMSHVKAI VSAWYSESTG NAMLSVPRNK QAYAWKQVMI

        250        260        270        280        290        300        310
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
PATTFLYLAT AAGFDTAILE GFDEAQVRRV AGLPPRFTVP VIISVGHGAK NGFHSVRSPR FPTKHLVRWG KF
```

----- PSORT;
----- Sítio de ligação ao FMN;
___ Domínio *Nitro-FMN reductase superfamily*.

Figura 49: Localização do domínio *Nitro-FMN reductase superfamily* e sítio de ligação ao FMN e PSORT (*putative mitochondrial targeting sequence*, WILKINSON et al. 2008) na sequência proteica da *Tc*NTR do haplótipo Esmeraldo da cepa CL Brener.

Na *Tc*OYE foi definido o domínio *OYE-like FMN*, o sítio de ligação ao FMN, o sítio ativo e o sítio de ligação ao substrato, conforme apresentado na Figura 50.

```
         10         20         30         40         50         60         70         80
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MATFPELLRP LKLGRYTLRN RIIMAPLTRC QATEDGHVPR TESMLKYYED RAEAGLIIAE ATMVQPNVTG FLTEPGIYSP

         90        100        110        120        130        140        150        160
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
NQIEEWRKIV DAVHKKGGLI FLQLIHAGRA GIPEKILQQS KSDQDPLAGR LLAPSAIPIK DHRIPAYFAA SCEKETYGVP

        170        180        190        200        210        220        230        240
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PELTDDEVRD GIIPLFVEGA KNAIFKAGFD GVEIHGANGY LLDAFFRESS NKRQSGPYAG TTIDTRCQLI YDVTKSVCDA

        250        260        270        280        290        300        310        320
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VGSDRVGLRI SPLNGVHGMI DSNPEALTKH LCKKIEPLSL AYLHYLRGDM VNQQIGDVVA WVRGSYSGVK ISNLRYDFEE

        330        340        350        360        370
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....
ADQQIREGKV DAVAFGAKFI ANPDLVERAQ HNWPLNEPRP ETYYTRTAVG YNDYPTYNK
```

----- Sítio de ligação ao FMN;
----- Sítio ativo;
----- Sítio de ligação ao substrato;
___ Domínio *OYE-like FMN*.

Figura 50: Localização do domínio *OYE-like FMN*, sítio de ligação ao FMN, sítio ativo e de ligação ao substrato na sequência proteica de *Tc*OYE no haplótipo não-Esmeraldo da cepa CL Brener.

Na sequência proteica da *Tc*FeSOD-A do haplótipo Esmeraldo de CL Brener (Figura 51) indica-se a localização do domínio SodA, Sod Fe N e Sod Fe C.

```
         10         20         30         40         50         60         70         80
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MLRRAVNISI ARGRMALMSY ATLPDLLKPS GAPAELPKLG FNWKDGCAPV FSPRQMELHY TKHHKAYVDK LNALAGTTYD

         90        100        110        120        130        140        150        160
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GKSIEEIILA VANDAEKKGL FNQAAQHFNH TFYFRCITPN GKAMPKSLES AVTAQFGSVE QFKDAFVQAG VNNFGSGWTW

        170        180        190        200        210        220        230
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
LCVDPSNKNQ LVIDNTSNAG CPLTKGLRPV LAVDVWEHAY YKDFENRRPD YLKEIWSVID WEFVAKMHAQ AIK
```

----- Sod Fe N;
----- Sod Fe C;
___ Domínio SodA.

Figura 51: Localização dos domínios SodA, Sod Fe N e Sod Fe C na sequência proteica de *Tc*FeSOD-A no haplótipo Esmeraldo da cepa CL Brener.

Para o transportador *Tc*ABCG1 foram definidas as regiões onde estão os motivos Walker A e Walker B, a assinatura ABC, o sítio de ligação a ATP e as regiões transmembrânicas das seis alfa hélices (FRANCO et al. 2015), conforme apresentado na Figura 52.

```
         10         20         30         40         50         60         70         80
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MSCCRAEVNE PVTPSSASSL ESDDQIAPKQ KGNEPQIEDY SIIAPGFSIK GSVAQFDAVE QNKSSVSGRF SIPVSWHNLS

         90        100        110        120        130        140        150        160
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
YSANGTKILC GLTGTALPSR CLAVMGSSGA GKTTFLNAIS DRLTTSRTLK LTGKRQLGDL EYKRHYRRMV GFVAQDDILS

        170        180        190        200        210        220        230        240
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PRATPEDSLR FSLRVRRGTS ISETNKFVEE TLEELRLVHC RETIVGIPGL VSGLSGGERK RTSIGVELIC DPKILLLDEP

        250        260        270        280        290        300        310        320
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TSGLDSVTSV KIVHLLNNIA RTGRTVIYTI HQPTAETLTY FDDLMLLTGG RCAYHGTMAK SVEYFESIGF PCPERYTPSD

        330        340        350        360        370        380        390        400
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
FFMKLLQDPE ISKVLVKKWK SYLKHGVRTP HTTAVELNPN PSESPTAKNI ESYLGRFGST SCIQFQELFR RFSMDLSRNH

        410        420        430        440        450        460        470        480
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VYIFSHFIQA AFFAVIVGLI FLNVKDDLAG MQDREGVFFM VTMNRAMGQT FIMVNSFMQD KALYVREQMV GSYSPFIFFL

        490        500        510        520        530        540        550        560
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SKTLVEFPMR VFFAFLECCI LYWMVGLYRQ AGAFFYYFAV IALLTEVASG LGFAIGATFK SLVVASGTAP VILLPLAMVG

        570        580        590        600        610        620        630        640
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GLLANTDRLH PYWYWLEKPS FIRQAYILLA RNEFKHIDHI RCDGRGKPPG FCKDKPQNGE DILRQLGFQQ KQYENWVLWL

        650        660
....|....| ....|....| ....|
TLALLYIAFR GWAVISLYSA ARTKF
```

----- Walker A;
----- Walker B;
----- Assinatura ABC;
----- Regiões transmembrânicas.
___ Sítio de ligação a ATP**;**

Figura 52: Localização do sítio de ligação a ATP, dos motivos Walker A e Walker B, da assinatura ABC e das regiões transmembrânicas na sequência proteica de *Tc*ABCG1 do haplótipo não-Esmeraldo da cepa CL Brener.

4.4.4.2 Sequências proteicas aceitas

Com os procedimentos anteriormente descritos, foi aceita uma sequência da NTR para cada organismo. Para a OYE, duas sequências para várias espécies de *Leishmania;* três para *C. fasciculata* e *A. deanei*, e onze para *S. galati*. Não foram obtidas sequências aceitas para *P. serpens.* Para FeSOD-A, foi obtida mais de uma sequência para cepas de *T. cruzi*, para *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* e *T. b. brucei.* Isto também ocorreu para espécies de *Leishmania*, *C. fasciculata*, *A. deanei*, *S. galati* e *P. serpens.* Para o *outgroup* (grupo externo) *B. saltans* também foram obtidas duas sequências. Para o transportador ABCG1, foi obtida apenas uma

sequência para espécies do gênero *Trypanosoma*. Para as demais espécies, exceto *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) tarentolae* e *B. saltans*, foram obtidas duas sequências.

4.4.4.3 Análise e alinhamento das sequências

O alinhamento das sequências proteicas completas foi realizado com o programa *BLAST* (BLASTP, NCBI), utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 como *query* (isca). Com isto foram obtidos os dados de: *Max score*, escore máximo resultante de um único HSPs (*High-Scoring Segment Pairs*); *Query coverage*, porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento; *E-value*, parâmetro de confiança; e *Identity*, identidade máxima obtida por um HSP, parâmetros que permitem avaliar melhor a similaridade das sequências.

4.4.4.3.1 NTR

Os parâmetros de identidade das sequências da NTR constam da Tabela 24 e os alinhamentos são observados na Figura 53.

Tabela 24: Identidade das sequências proteicas de NTR, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.

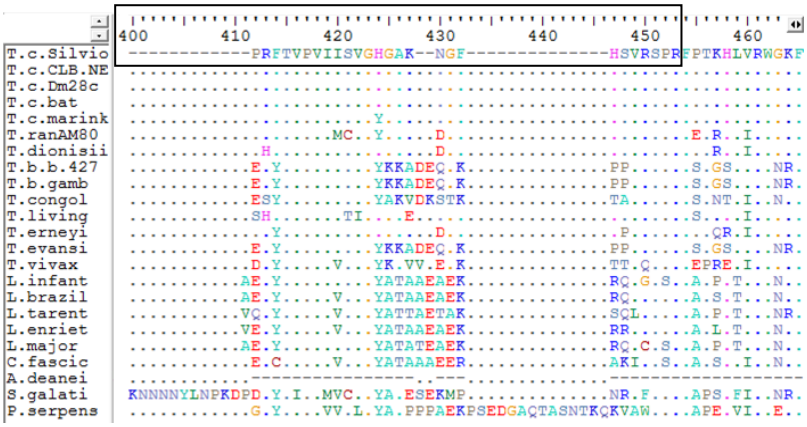
Organismos	Max score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)
T.c. Silvio	649	100	0	100
T.c. CL B. Esm.	566	100	0	94
T.c. CL B. NEsm.	623	100	0	96
T.c. Dm28c	644	100	0	99
T. c. bat	637	100	0	98
T. c. marinkellei	550	100	0	90
T. rangeli AM80	416	100	2,00E-150	66
T. rangeli SC58	413	100	2,00E-149	64
T. dionisii	486	100	3,00E-178	80
T.b. brucei 427	327	97	3,00E-115	55
T.b. brucei 927	327	97	3,00E-115	55
T. b. gambiense	326	97	5,00E-115	54
T. congolense	296	78	1,00E-103	63
T. livingstonei	440	100	6,00E-160	72
T. erneyi	470	100	8,00E-172	76
T. evansi	327	97	3,00E-115	55
T. vivax	319	80	3,00E-112	63
L. (L.) infantum	283	76	9,00E-98	57
L. (V.) braziliensis	283	76	2,00E-98	57
L. (L.) tarentolae	277	76	2,00E-95	56
L. (L.) enriettii	289	81	4,00E-100	56
L. (L.) major	286	76	3,00E-99	58
C. fasciculata	278	76	5,00E-96	55
A. deanei	169	65	1,00E-53	40
S. galati	204	74	2,00E-66	41
P. serpens	242	84	3,00E-82	44

```
                 10        20        30        40        50        60        70        80        90
T.c.Silvio  MKR-------------------------------------NDIKRGLWDSLILY------WRWNRESLLRNVSAFAENGRHVIGM------D---
T.c.CLB.NE  ........................................G.......................N......T......................
T.c.Dm28c   ........................................................................................
T.c.bat     .R......................................................................................
T.c.marink  ........................................Q.R.....TS.............N.A..L....G..K....T..........
T.ranAM80   ........................................GVQ.S....VQS..........KQSNVAAAA..TGAAAAV----......R...
T.dionisii  .R......................................ALQ.R....VKS............SH.AATSA.A.A...QG..S.........
T.b.b.427   NVS.....................................RCRWQ.VIK..RS........K..AGAA.SATNSQNSTSPY----......-...
T.b.gamb    NVS.....................................RCRWQ.VIK..RS........K..AGAA.SATNSQNSTSPY----......-...
T.congol    ..A.....................................SGRRH.VMA..RS........N.KASNVASATTPQRVVA------......-...
T.living    ..G.....................................G.Q.RI...VSS..........K.SNVTASS.S.FASAAATA.G......G...
T.erneyi    ........................................GVQKR....VKS........L...SN.AGTSA.ATTA.DGGRV.......A...
T.evansi    NVS.....................................RCRWQ.VIK..RS........K..AGAA.SATNSQNSTSPY----......-...
T.vivax     .LW.....................................SGQRCEQMKLPQS.HTLCIPGN.GMQRRHFSW.SLSSLPPF----......-...
L.infant    .L.RSRRLLLAAAGARPAAFTPRAREAAGTCGN....EERDSNTSSGHG.FLAT.RHL......VA...TNAAAAA.S-----SS----......-...
L.brazil    ---.....................MFRHSRCSN....K....AR.GTSS.FLAT.RSL......VT.G.A.ATVAS.S-----SP----......-...
L.tarent    .L.HSRRLPLVATAAHPAASTSRASEAPSTCSN....EVCHRNTSGGSG.FLAT.RSL......VA...TNAAAAS.S-----SS----......-...
L.enriet    .LGHSCRRLIAAAGAGAGATSPRVSDAASACGN....EVREGS..NGNG.CLAR.RNL......MV...TNAAAVALS-----SP----......-...
L.major     .L.RSPRLLLVAAGARPAASTPRASEAAGTCGN....EERHSNTSSGHG.FLAT.RHL......VA...TNAAAAA.S-----SS----......-...
C.fascic    .L.QGRCLRVARSAVGEA.....................SGSNSSATPQ.E.IFAM.RRL......IA..SANAAAGTAVA.SLSSS----......-...
A.deanei    ---.....................................MFKQNKIQ.ESFLKIISNL......YQ..KTNAAAQLEKY----------......-...
S.galati    .L.SSRRVLSG.............................YNNNNNN.NNNNSFFTI.RNL......VQ..KTNSAAAT..VSGSPFYQTLQLYWLTLTRTY
P.serpens   ---.....................MSKKDSTAGLSPSRKASSRSTP.G.N.SA------......---------TGAADAPH--------......-...

            100       110       120       130       140       150       160       170       180       190
T.c.Silvio  GPVETGSE-KG-VGRGNSSMPPFF--------------SSMPPSLSS---SSSLPLDAMKRVVHERRSCKRFDPTKPIDLDVVSDLLAMTVRAPTALNI
T.c.CLB.NE  ....A.....D.......Y...I.......................P.-.........T...........................................
T.c.Dm28c   ........................................SSS.....................................................
T.c.bat     ....A.........H.........................S.......................................................
T.c.marink  .R..G....RD.M.G....I.S...................V...S.-.SS.....................E.....I....S...S.....
T.ranAM80   .GKNG.LGEA..L.H..VPTST.................P.L------..L...S....V.G..RD..T.R.....R.V....LN.I..V......S...
T.dionisii  .HG.G....RE.GR.....I....................L-----..S...S...S..H...G.....H.................EV.........
T.b.b.427   --------.ET.W.S.I.RFFT.LRSSIAATAQEVPREPDRI..--TYYSKA.RKS...FI...ER.H.S....SSR.V.HTLIAR..EA.T.....F..
T.b.gamb    --------.ET.W.S.I.RFFT.LRSSTAATAQEVPREPDRI..--TYYSKA.RKS...FI...ER.H.S....SSR.V.HTLIAR..EA.T.....F..
T.congol    --------.--.------------------------.----.--PRAAPT..QS..VFLHT.N....T....SSR.V..AL.AR..ETST.....F..
T.living    SC.DS..QGEL.L...K..TSF.-...............-------..SSS...SS..SV.....D.........R.V..N......SA......G...
T.erneyi    R-------.A..A..DA..T.FSL...............F.-----TPSSPPP.T..ESF...............R.....................
T.evansi    --------.ET.W.S.I.RFFT.LRSSIAATAQEVPREPDRI..--TYYSKA.RKS...FI...ER.H.S....SSR.V.HTLIAR..EA.T.....F..
T.vivax     --------.SS.WRHR--------...VLGTRLDASDPSKKCT.--TYDSST.NKA.ESAL...R....S......RAV..NL.DE..TAS......F..
L.infant    --------.--.------------...AS..........C----AETPACV.NNAA...VEA..RA.WT.RQ..TA......TLKRV..A.T....GF..
L.brazil    --------.--.------------...AS..........C----GRTAGCI.AGVA...VEAA.RN.WT.RQ..TA.T....TLRRV.TA.T....GF..
L.tarent    --------.--.------------...AS..........C----AATPKCI...AA..TVEAA.RV.WT.RQ..TE..V..HTLKRV..A...S..GF..
L.enriet    --------.--.------------...VS..........C----ATTPAPI..GAA...VEAA.R..WT.RQ..TA.....GTLKRI..A.T....GF..
L.major     --------.--.------------...VS..........C----AETPACV...AA...VEA..RD.WT.RQ..TA......TLKRV..A.T....GF..
C.fascic    --------.--.------------...TSSS.....SATAASTRQAQARQD...AA.S.VEAA.LH.WT.RN...SR...MKQLERV..A.T....GF..
A.deanei    KNKNNNTKNNN.NNKEI--QKS.-...........FS...--------.NNKNQNHN.SV.TDI.NA.Y...Q.SSE.K.ENELI.KI.NH.R....GF..
S.galati    KTLQDEKKRNNLNNKAS..SSTLLNKNQ.....NLK...---NNNNNTNNNFDFPA.AHLET...Q.Y..R.....QKVPKPLLEKI.KL.T.S..GY..
P.serpens   --------.--.------------.............VNVA..AEGPGLHHFDKNV.STVES.IIN.WT.RN..E.RSV.ENLLRRI.NT.M....GF..

            200       210       220       230       240       250       260       270       280       290
T.c.Silvio  QPWVAVVIHEEEQRETLSRAALGQPQPRDAPVTVVFAGDMEPESNAPAALEMGLE---------------SGYYHSLYGAAYLRHVYYLLHGGPCEAMS
T.c.CLB.NE  ........................................................................................A.......
T.c.Dm28c   ........................................................................................
T.c.bat     ........................................................................................
T.c.marink  ...................................E....I....V.............................P..............V..
T.ranAM80   .......VC.....AA......S...........I.........R.......H.....................LDPM...N...NT.........V.SI.
T.dionisii  .......V..K....A...........C.....I.........R.......L.............................T....A........W.V..
T.b.b.427   .....I.V..TS..GA..H...D.....E.............WR......L..N.....................P.......L...H.....FGS.A
T.b.gamb    .....I.V..TS..GA..H...D.....E.............WR......L..N.....................P.......L...H.....FGS.A
T.congol    ......AV...S..AA..H...S.........S.........RR......L..N................T...G.R...T...L...H..T..FG.LA
T.living    .......V..AA...A.......................Q..R.....................D.....T....T........W.C..
T.erneyi    ........AG...A.A.......................W.....................R....................W.T..
T.evansi    .....I.V..TS..GA..H...D.....E.............WR......L..N.....................P.......L...H.....FGS.A
T.vivax     ...A.I.V..HT..VA..Q.....L..LE...S.........RR......L..N................TN..KP....S...S...H.....LGV.A
L.infant    .G.H...VTNTAV..Q.FK.......VLQ..A....V..T...R...Q.......................T...SP........NI..FM....MQS.A
L.brazil    .G.H...VTSTAV..Q.VK.......VLQ..A....V......R...QT......................T...DP...S....N...F.....MQS.A
L.tarent    .G.H...VTNPAV..Q.FK.S.....VLQ..A....V..T...R...Q......D................T...GP...P....N....M....MQS.A
L.enriet    .G.H...VTNT.V..Q.FQ.......VLQ......V..V...R...Q.......................T...GP....T...N...FM....MQS.A
L.major     .G.H...VTN.AV..Q.FK.......VLQ..A....V..T...R...Q.......................T...SP....T...NI...M....MQS.A
C.fascic    .G.F...VT.QAV..Q.FQ......PVLQ.......I..T...R...Q...I....................T...GP...P.F...N...FM....MQS.A
A.deanei    .G.HV...DN.TLKQQ.C..C...R.ILN.SHSFI.L..K.C.R..........KKVKINNEKNENNNHNV.S..GD...PS...Q...Y..Q..FQT.Q
S.galati    .GFHM..LES.ADKQQACI.S...R.VL..SYI.I.VA.K.V.R.....F.L..NN...............NY.RT.M...S...Q...Y.....GNS.A
P.serpens   ...H.I.VQDA.R.KA.CT.V.....VAK...SI..V....A.R...Q...I....................LPES.APLF..N...F.....LRVLA

            300       310       320       330       340       350       360       370       380       390
T.c.Silvio  HVKAIVSAWYS--------------------ESTGNAMLSVPRNKQAYAWKQVMIPATTFLYLATAAGFDTAILEGFDEAQVRRVAGLP----------
T.c.CLB.NE  ........................................................................................
T.c.Dm28c   ........................................................................................
T.c.bat     .....A..................................................................................
T.c.marink  ........................................................................................
T.ranAM80   .I.SFL.........................KA..HPL....TS..G.....A...V..............G..........KQ.V.............
T.dionisii  ...S...T.......................................................S........................
T.b.b.427   KA.SCI.S.......................NA..TPL....TTM.G.....A.......I.A.....L...........K..E.V.............
T.b.gamb    KA.SCI.S.......................NA..TPL....TTM.G.....A.......I.A.....L...........K..E.V.............
T.congol    QA.SCI.S.......................S...TPL.T..TTMKG.....A.........A.A...L....I.....EK..G.V.............
T.living    .M.SL..S.......................D...TP.....T.........A...........AS.....V............T.............
T.erneyi    .L.S...........................................T.........A...........................................
T.evansi    KA.SCI.S.......................NA..TPL....TTM.G.....A.......I.A.....L...........K..E.V.............
T.vivax     .A.SCL.SI......................R...TP.....TTM.G.....A.......F.....SL......L...K..E.V.............
L.infant    A..SV..........................QAA.TPLI...VSRAG.....T.......VN.CA...W..CMM..I..DA.K.AL.V...........
L.brazil    A..SA..........................RAA.TPLV...VSRAG.....TL......VQ.C....W..CMM..I..EA.KQ.L.V...........
L.tarent    A..SV..T.......................RAA.TPLI...VSRVG.....T.......VH.C....W..CMM..I..DA.K..LCI...........
L.enriet    A..S...........................RTA.TPLV...VSRAG.....T...AA.VQ.C....W..CMM..I..DA.K.AV.V...........
L.major     A..SV..........................RAA.TPLI...VSRTG.....T.......VN.C....WE.CMM..I..DA.K.AL.V...........
C.fascic    AA.SVI.G.......................RAA.TPLV...VSRAG.....T.......VQ......WH.CMM..I..DA.K..L.V...........
A.deanei    CA.NLT.YL.NFSISKNNNTNIYQNHQNHHRLPNHYTPL.T..TSAT...Q..TIFAVS.....C....LQ.CVM.....HA.ENRR----------
S.galati    C..RK..EA.TSAVNKS..............SQN.KV.LIT..ESPT......S.LACGL..H.C...EVQ.SA......NALKHLI..EKKKSNNNSNS
P.serpens   LG.SLW.SF......................KL..TPL....VSMKS.....T...V...VH.C....LN.C.M..M..EA.KN.M..S..........
```



Domínio *Nitro-FMN reductase superfamily*; PSORT; Sítio de ligação ao FMN.

Figura 53: Alinhamento das sequências proteicas de NTR entre os organismos.

4.4.4.3.2 OYE

Os parâmetros de identidade das sequências da OYE constam da Tabela 25 e os alinhamentos são observados na Figura 54.

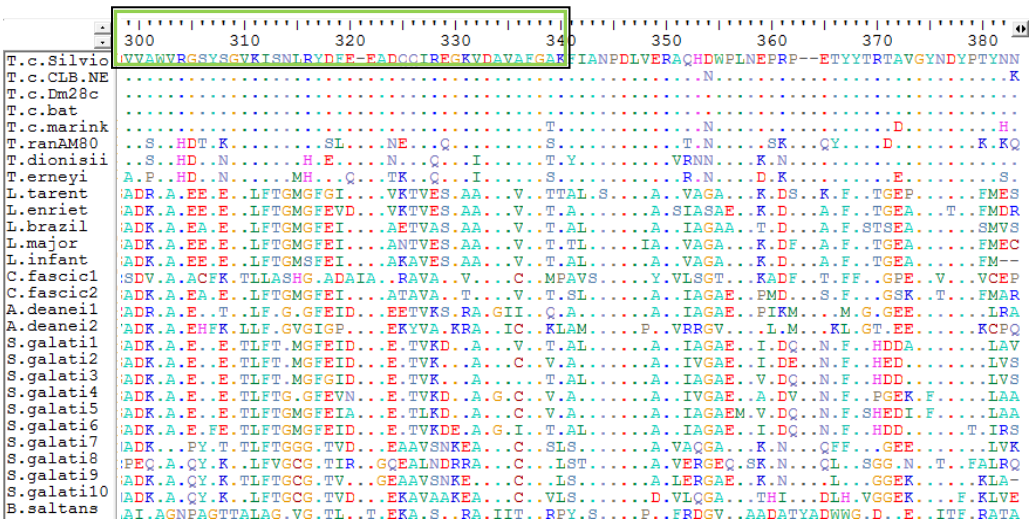
Tabela 25: Identidade das sequências proteicas de OYE, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.

Organismos	**Max score**	**Query cover (%)**	**E-value**	**Identity (%)**
T.c. Silvio	786	100	0	100
T.c. CL B. NEsm.	775	99	0	99
T.c. Dm28c	786	100	0	100
T. c. bat	786	100	0	100
T. c. marinkellei	750	100	0	95
T. rangeli AM80	613	99	0	76
T. rangeli SC58	618	98	0	77
T. dionisii	679	99	0	84
T. erneyi	670	99	0	83
L. (L.) infantum	307	97	6,00E-105	43
L. (V.) braziliensis	332	97	4,00E-115	46
L. (L.) tarentolae	318	97	1,00E-109	44
L. (L.) enriettii	307	97	9,00E-105	44
L. (L.) major	305	97	3,00E-104	43
C. fasciculata 1	293	98	1,00E-99	43
C. fasciculata 2	315	97	4,00E-103	47
A. deanei 1	321	99	1,00E-110	46
A. deanei 2	291	98	3,00E-99	43
S. galati 1	317	99	6,00E-109	44
S. galati 2	318	99	1,00E-109	46
S. galati 3	318	99	4,00E-109	46
S. galati 4	303	99	4,00E+104	45
S. galati 5	318	99	1,00E-109	46
S. galati 6	301	99	1,00E-102	44
S. galati 7	296	97	4,00E-101	42
S. galati 8	268	96	2,00E-90	40
S. galati 9	307	98	1,00E-105	45
S. galati 10	298	98	6,00E-102	44
B. saltans	172	97	3,00E-53	33

```
                 10        20        30        40        50        60        70        80        90
T.c.Silvio   LKLGRYTLRNRIIMAPLTRCQATEDGHVPRTESMLKYYEDRASAGLIIAEATMVCPNYTGFLTEPGIYSDACIEEWRKIVDAVHKKGGLIFLCLIHAG
T.c.CLB.NE   ..................................................................................................
T.c.Dm28c    ..................................................................................................
T.c.bat      ..................................................................................................
T.c.marink   .......I....V.......R...........P.....................................................................
T.ranAM80    ..V.....P..MV.......R....D.....DL...H.....................SA..S.........VQ..K...GX............H.G.
T.dionisii   .R.......................Y......L...................I.H.H.SA..S.........D..K.......E.............
T.erneyi     ..V..................R....E......L...................I...H.S..VS............K.................
L.tarent     .VI.GKSM...FV.......R.DD.-...-NAA.V.H.A....M....T...QI.KG.ST.VR.G....KEHVDG.K.VT....A...V..C.IH.G.
L.enriet     .VI..LSMA..FV.......R.DDN-...-.AA.V.H.A....M....T...QI.EG.ST.VH.G...GKE.VDG.KRVT....D......C.IHNG.
L.brazil     .VI.QLSMS..FV.......R.DDE-...-.PA.VR..A....M....T...QIEKG.ST.CH.G...GKE.VDG...VT....E......C.IHNG.
L.major      .LV.GRWMS..FV.......R.DDN-...-.AA.V.H.S....M...LT...QIHKG.ST.AH.G...GKE.VDG.K.VT....D...I..C.IHNG.
L.infant     .LV.GRPIS..FV.......R.DDN-...-.AA.V.H.S....M....T...QI.KG.ST.AH.G...DKEHVDG...VT....D...I..C.IHNG.
C.fascic1    CR...H.M...FVLS.....R.DD.-...-.PM.VQ..A....M..L.T.SI.IEEG.SAMAY.....N....AA.KRVT....AR....VA..Y.G.
C.fascic2    .VI..TSMA..FV.......R.DD.-...-..D.V...A....M....T...QI.KG.ST.AH.G...GKE.VAG.K.VT....A.....YC.IHNG.
A.deanei1    .QV.....P..F.......TR....-..A-.DA.V...T....F.......CQIREG.ST.AY...V.GK..V.G.K.VTQS..E.......IH.G.
A.deanei2    .SV.KI.IK..FV......TR.DL.-.I.-K.P.V.H.A....F.........AKDG.ST.AR.....NED..AG.K.VT....GN..Y.Y..IH.G.
S.galati1    .Q..KA.MA..FV.SA....R...T-.I.-SD..V...S....L....T...QIEDG.ST.AY.A...GKE.V.G...VT....A.....YC.IH.G.
S.galati2    .QI.KA.MA..FV.S..A..R...T-.I.-NDA.A...S....F....T...QIEDG.S.CGV.....GKE.VAG...VT....A......C..H.G.
S.galati3    .QI.KA.MA..FV.S.MA..R...T-.I.-SD..A...S....M....T...QIEDG.S.CGV....FGK..V.G...VT....A.....YC..HNG.
S.galati4    .Q..KA.MA..FV.......R...T-...-.DA.V...S....F.......QIEEG.ST.GY.....GEE.VAG...VT....A.....YC.IHNG.
S.galati5    .QI.KA..A..FV.......R.PLN-...-.DA.V...S....M....C...QIEEG.ST.GF.G...GKE.VAG...VT....A.....YC..H.G.
S.galati6    .Q..KA.MA..FV.......R...T-...-.DA.V...S....M....T...QIEEG.ST.GF.G...GKE.VAG...VT....A.....YC.IHNG.
S.galati7    ..I.NQ.MK..FV...II.VR.DA.-...-.DM.V.H.S...DF....T.V.TIKNG..T.MRD....GA..V.R...VT....A.....YT..Y.G.
S.galati8    ..I.NQ.MK..FVVP....VR.DDN-...-.NM.VQH.A...GF.........I.EG.ST..R.....GP..VAG...VT....A.....Y...F.S.
S.galati9    ..I.AL.MK..FVVP....VR.DDN-...-.D..VQ..AE.SGF.........KEG.ST..R.....GP..VAG...VT....A.....Y...H.G.
S.galati10   ..I.NQ.MK..FV.P....AR.DA.-...-.DL.VQH.S...GF..L.......GG.SS.MR.....GP..VAG...VT....A.....H...Q.G.
B.saltans    AGA.GI.YK...GF.....GR.DAKTGCV-KDIHAV..SE...S..LFT.G.GISRKGL.WFCA....TPE.V.A.KQVTS...AE.....C..W.M.
```

```
                100       110       120       130       140       150       160       170       180       190
T.c.Silvio   RAGIPEKILQQPKSDQDPLAGRLLAASAIPIKDHRIPAYFAASGEKETYGV-PEELTDDEVRNGIIPLFVEGAKNAIFKAGFDGVEIHGANGYLLDAFFP
T.c.CLB.NE   ..........S.............P.......................................D.......................................
T.c.Dm28c    ..................................................................................................
T.c.bat      ..................................................................................................
T.c.marink   ..............N.......................H........P.....................................................L.
T.ranAM80    .X.L.H...R.Q...KE..........XL..VE.Q..PF.SE.....P..........NDIQ...X....QA.I..VH...................G.L.
T.dionisii   .....Q........ETE.............TG.Q..PRYT......P...........IQ..............V.........V.........G...
T.erneyi     .....H.V...Q...EE.............T..K..PQ.SS..G..P...........I...............V.........V.........E...
L.tarent     .STV.SN.EEGMHIV-A.------S.V--A.T..ECSEL..R..I.QP.P...HAM.AE.IA-TCVT.YSSA....M-A.......V.......I.Q.LK
L.enriet     ..TVASNVAEGMRIV-A.------S.V--A.TG.ECA.A..RD.K.QP.P...HAM.AE.IA-HYVK.YATA.R..M-A.......V.......I.E.LK
L.brazil     ..TV.SNVDEGVRIV-A.------S.V--A.T..EC.GA..RN...QP.P...H.M.AEDIA-LYVK.YATA.C..M-A.......V.......I.E.LK
L.major      .STV.SNVDEDVRIV-A.------S.V--A.TG.KCAGS..RN.KTQP.P...HAMAAE.IA-SYVK.YAAA.R...-A.......V.......V.Q.LK
L.infant     .STV.SNVDEGVRIV-A.------S.V--A.TG.KCAGS..RN.KTQP.P...HAMAAE.IA-SYVN.YAAA.R...-A.......V.......I.Q.LK
C.fascic1    ..TVAANLTLPHLFPTGA------S.VP.LPNAEQCM.AWCRD.VAQPFAQEVK.M.TTD..-RMVG..TQA.R...-D......L.AGT.F...Q.L.
C.fascic2    ..TV.CNVTGGL.IV-A.------S.I--A.EG.ESA.P.NL.....P.P...T...K..IA-EYVQ.YATA.H...-A......QV.......I.Q.LK
A.deanei1    ..TVQCNLDDGI.VC-G.------SEQ--G.VN.SC.GA..KD...QP.PAKVHA..EK.IE-YHVK..TVA....M-A......Q.....S..I.S.L.
A.deanei2    .STLQ.NLKEGLQVE-SC------TTQ--G.QK.--GTA.TM....KP.PPEVHA..IP.IK-A.VQC..QA....M-.......QV........Q.IK
S.galati1    ..TV.SNLAPGK.IV-SS------TTV--G..G.EC..A..QNN..QP.PESVHA..QA.IA-FYVK.YATA....M-A...............I.Q.L.
S.galati2    .STV.CNVAPGK.IV-G.------TTV--G....ECT.A..QN.K.QP.PAEVHA..QE.IA-YYVKVYATA....R-A...............V.Q.L.
S.galati3    ..TV.SNLAPGK.IV-SS------TTV--G..G.EC..A..LNN.TQP.PAEVHA..QE.IA-YYVK.YAVA....M-A.......L.......I.Q.L.
S.galati4    ..TV.CNMSEGK.IV-GC------TSK--G.VK.QC.PG..FDRK.QP.PEEVHA..QK.IA-HYVN.YATA....M-A...............I.Q.L.
S.galati5    ..TV.CNVAAGK.IV-SS------TKQ--G..N.SC..S..QN...QP.PEEVH...HE.IA-YYVK.YAVA....M-A...............I.Q.L.
S.galati6    .STV.CNVAEGK.IV-SS------TKQ--G..N.SC..T..QNN.TQP.PAEVH...HA.IA-YYVK.YAVA....M-A...............I.Q.L.
S.galati7    ..V..ANAMGGLIVS--S------TEK--G.QNGKLYNA.SPTD.AAP.PTKVHA..K..IK-EHVE..AKA.....-D......QV.....F.I.Q.IK
S.galati8    .CTTE.NVTDGAVVS--S------TEK--G.QHQKVLPL.TKGQSAQPFPTKVHA..KE.IK-EHVE..AAA.....-D......Q........I.Q.TK
S.galati9    ..TT..NVSDGVVYS--A------TEK--G.LK..QRQF.NTT.AVQAFPTKVHA..KE.IK-ENVKI.ATA.....-D......QV.......I.Q.IK
S.galati10   .FTT..NVADGVVFS--A------TEK--G.EG..QRP..HP...ATPFPSKVHA..KE.IK-.LVDI.ATA....M-E......QV.......I.Q.TK
B.saltans    ..CHSDVTG.P-IVS----------...LALEG----EVT.VNH..KP.E...HA..VE.IA-..VRDYATA...S.-E......QL.S.....V.Q.IQ
```

```
                200       210       220       230       240       250       260       270       280       290
T.c.Silvio   ESSNKRQSGPYAGTTIDTRCQLIYDVTKSVCDAVGSDRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQQI-G---------L
T.c.CLB.NE   ..................................................................................................
T.c.Dm28c    ..................................................................................................
T.c.bat      ..................................................................................................
T.c.marink   D.......................................VS.ND.................................S.............
T.ranAM80    D.A.....SR...N...........I...............X...I.SAG.L...D.........R...........X....IFGK.E............
T.dionisii   D............A...........I..NL..................SIG.................................F...L............
T.erneyi     D.....L.....................N.................STME.T.T.....................F.....LH.KP.............
L.tarent     SG..Q.TDQ--Y.GSMEN..RFLLE.LDA.IE.I..EH.A.......SFN.QG.E...V..RYI.SQLNLRRI.F.DV....FFSPSR.-.........G
L.enriet     SG..H.TDE--Y.GSVEN..RFLFQ.MDA.IE.I.RE.........SFNNQS.E......RYI.SQLNSRRI.F.DVM..NFYSSVR.-.........G
L.brazil     S...Q.TDE--Y.GS.EN..RFLFE.LDA.IK.I.RE.........SFNSQS.E......R.I.SQLNSRNISF.DVM...FFS.AC.-.........G
L.major      T...Q.TDE--Y.GS.EN..RFLFE.LDA.IE...RE.........SFNDQS.E......RYI.SQLNCRRI.F.DVV...FFSPAR.-.........G
L.infant     T...Q.TDE--Y.GS.EN..RFLFE.LDA.IQ.I.RE.........SFNDQS.ED.Q...RYI.SQLNLRTI.F.DVM...FFSPAR.-.........G
C.fascic1    T.....TDE--Y.GS.EN..RFLLE.VSA.SA.I.A....V.LT..DSTN.QS.V......RF..R.L.QRRV.F.DLF...PKAKEV.A.........F
C.fascic2    T...T.TDE--Y.GSLEN..RFLLE.VDA.IKKI.KE.TA.......TFN.ES.E......RYI.AQLNSRK..F.DVM...FFTPAR.-.........G
A.deanei1    DGA...TDA--Y.GSVEN..RFLLEIVD..VA.I.A...SV.L....AYNDTT..D..G..RYV.GELSKRK..F.DVM....F.PAAPK.........E
A.deanei2    D.C.T.TDE--Y.GS.PN..R.LLEIVDG.IQ.I.KEN.AV.L....TYNEAV.....ET..Y..QELSKREI.F.DV...A.FFSATD..........V
S.galati1    DGC.R.LDE--Y.GS.EN.SRFLFE.VDA.VE.I.KEH.........AYNN.A..D.....RYV..ELSKRKI.F.DIM.A.FFSTTS.-.........G
S.galati2    DGV.T.TDE--Y.GS.EN.SRFLLE.VDA.V..I.KEH..V......AYND.SE.Q.....R.V..ELSKRKI.F.DVI...FFGPST.-.........G
S.galati3    DGV.T.TDE--Y.GSLEN.SRFLFE.VDA.IE...REH........AYND.S........RYI..ELSKRKI.F.DV..A.FFSTTS.-.........G
S.galati4    DGC.T.TDE--Y.GSLEN.SRFLLE.VDA.IA...KEH.......Q.N.NN.SE.D.....RYV..ELSKRQ.SF.DVI...FYGPAR.-.........G
S.galati5    D.C.T.TDE--Y.GS.EN..RFLLE.VDA.IA...KEH........TFND.S........RYV.GELSKRK.VF.DV...FFSAAS.-.........G
S.galati6    DGC.T.TDE--Y.GS.EN.SRFLLE.VDA.IA...KEH........AYND.S........RYV.GELSKRKIVF.DIM...FFSAAS.-.........G
S.galati7    D.P.N.TDE--Y.GSVEN..RFLFE.VDA.TAM..KE.TA.......VYNETS....Q.TA.YIGEELSKRDI.F.DVM.R.LLGTE-...........N
S.galati8    D.C.D.TDA--Y.GNVEN..RFLFE.VDA.IA...KE.TA.......VYNEAS.N....T..YI.EQLSKRNI.F.DV..RASSSSVG...........F
S.galati9    DT..D.TDE--Y.GS.EN..RFLFE.MDA.TA...KE.TSV......VYNEAS......TA.YI.EELNKRDI.F.DV..R.LFSGE-...........G
S.galati10   ....T.TDE--Y.GSVEN..RFLFE.VDA.IAV..KE..SV......VFGQAT......T..YI.EELNKRDI.F.DV..R.LFSPD-...........N
B.saltans    SC..Q.TDA--Y.GS.EN.LRFLKE.LAAIVAEIPKE..WV.F..NGAYN.QGSADNIETFDAAI.LAASFQIGGVEVMD.LAFGFHQKSEPYTLERARA
```



Domínio *OYE-like FMN;* Sítio de ligação ao FMN.

Figura 54: Alinhamento das sequências proteicas de OYE entre os organismos.

4.4.4.3.3 FeSOD-A

Os parâmetros de identidade das sequências da FeSOD-A constam da Tabela 26 e os alinhamentos são observados na Figura 55.

Tabela 26: Identidade das sequências proteicas de FeSOD-A, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.

Organismos	Max score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)
T.c. Silvio	491	100	0	100
T.c. CL B. Esm.	487	100	0	99
T.c. CL B. NEsm.	487	100	0	99
T. c. bat	486	100	2e-180	99
T. c. marinkellei	470	100	4e-174	94
T. rangeli AM80	426	99	7e-157	84
T. dionisii	435	100	2e-160	85
T.b. brucei 427	371	99	8e-135	74
T.b. brucei 927	380	100	2e-138	76
T.b. gambiense	380	100	1e-138	76
T. congolense	370	99	1e-134	74
T. livingstonei	404	100	3e-148	79
T. erneyi	454	100	7e-168	89
T. evansi	377	100	4e-137	75
L. (L.) infantum	306	93	9e-107	65
L. (V.) braziliensis	308	100	5e-110	62
L. (L.) tarentolae	310	100	6e-111	61
L. (L.) enriettii	301	93	1e-105	64
L. (L.) major	309	98	2e-110	63
C. fasciculata	311	99	2e-111	64
A. deanei 1	261	79	2e-92	66
A. deanei 2	314	100	1e-112	64
S. galati	315	96	7e-113	65
P. serpens	282	95	9e-100	60
B. saltans 1	279	99	1e-98	55
B. saltans 2	278	95	3e-98	56

Domínio SodA; Sod Fe N; Sod Fe C.

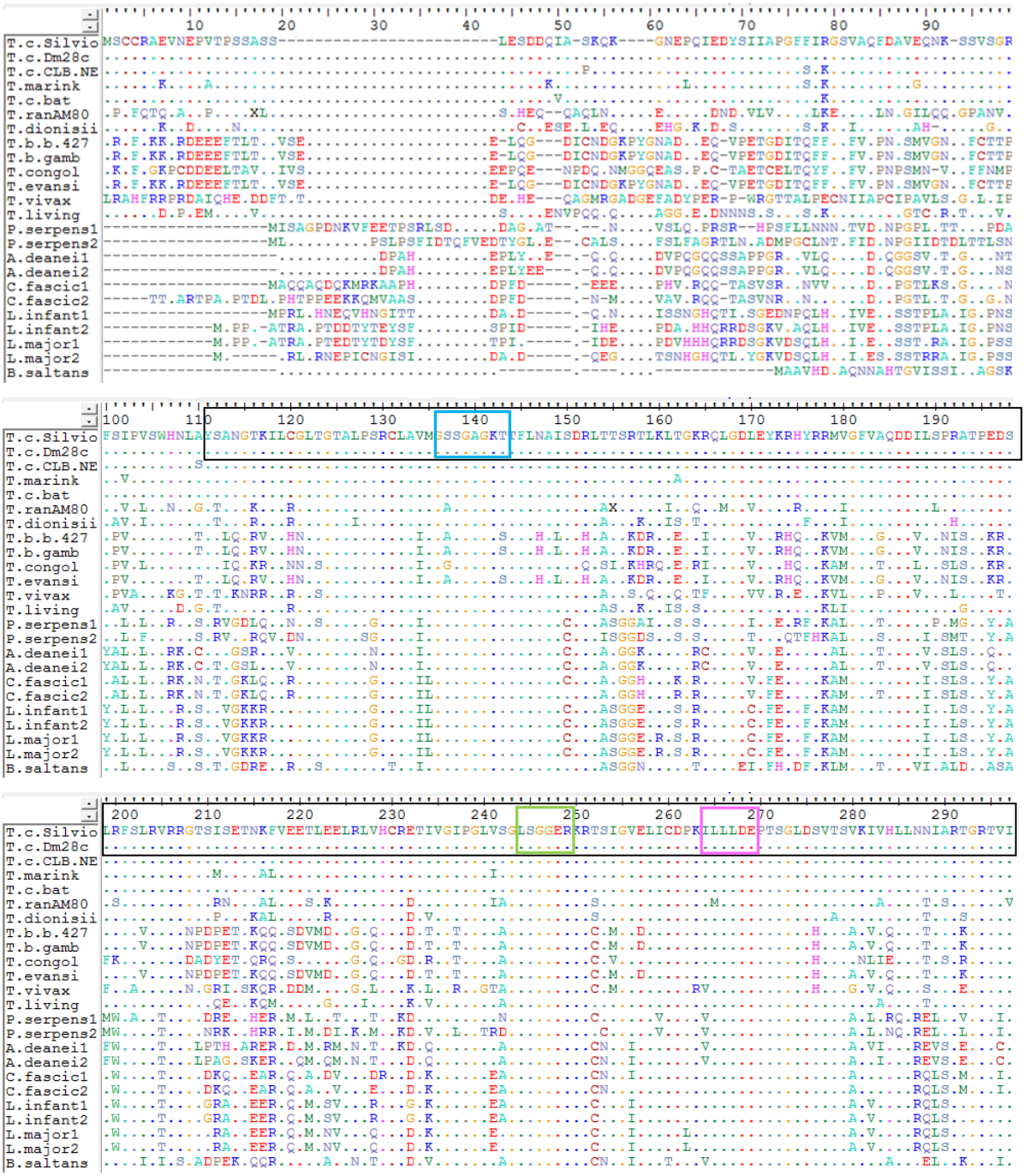
Figura 55: Alinhamento das sequências proteicas de FeSOD-A entre os organismos.

4.4.4.3.4 ABCG1

Os parâmetros de identidade das sequências do transportador ABCG1 constam da Tabela 27 e os alinhamentos são observados na Figura 56.

Tabela 27: Identidade das sequências proteicas do transportador ABCG1, utilizando a sequência da cepa Silvio X10.cl1 de *T. cruzi* como *query*.

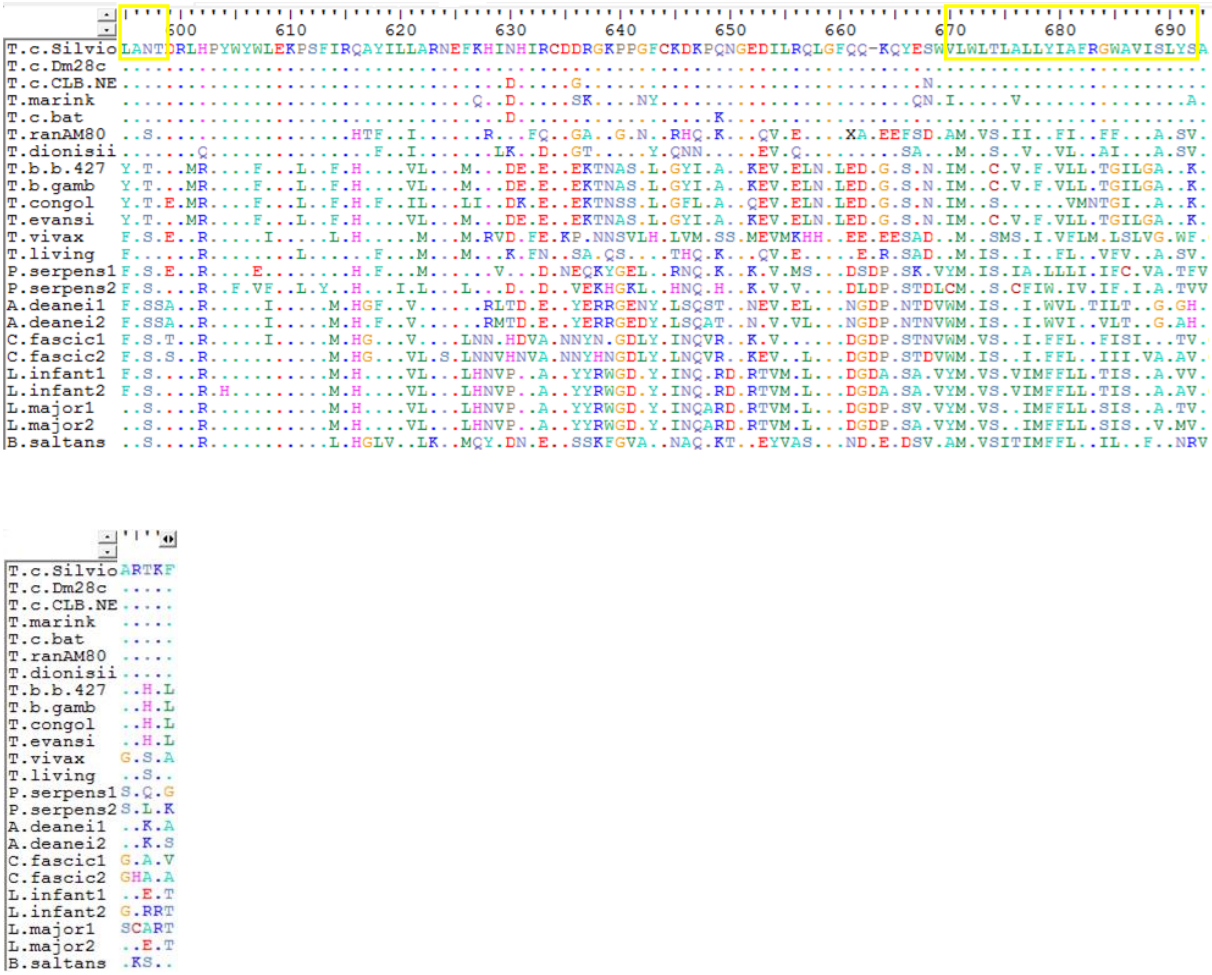
Organismo	Max score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)
T.c. Silvio	1379	100	0	100
T.c. CL B. Esm.	1352	100	0	98
T.c. CL B. NEsm.	1360	100	0	98
T.c. Dm28c	1379	100	0	99
T. c. bat	1365	100	0	99
T. c. marinkellei	1310	100	0	94
T. rangeli AM80	1012	100	0	72
T. rangeli SC58	1028	100	0	73
T. dionisii	1130	100	0	82
T.b. brucei 427	734	100	0	54
T.b. brucei 927	733	100	0	54
T.b. gambiense	734	100	0	54
T. congolense	710	100	0	53
T. livingstonei	1062	100	0	76
T. erneyi	851	75	0	82
T. evansi	734	100	0	54
T. vivax	705	97	0	54
L. (L.) infantum 1	771	98	0	56
L. (L.) infantum 2	780	93	0	59
L. (V.) braziliensis	539	61	0	62
L. (L.) tarentolae	365	40	8,00E-125	64
L. (L.) major 1	785	92	0	59
L. (L.) major 2	780	98	0	57
C. fasciculata 1	802	94	0	59
C. fasciculata 2	798	93	0	60
A. deanei 1	725	93	0	57
A. deanei 2	739	93	0	58
S. galati 1	557	67	0	59
S. galati 2	622	78	0	56
P. serpens 1	722	93	0	56
P. serpens 2	632	89	0	50
B. saltans	684	90	0	53


T.c.Silvio
T.c.Dm28c
T.c.CLB.NE
T.marink
T.c.bat
T.ranAM80
T.dionisii
T.b.b.427
T.b.gamb
T.congol
T.evansi
T.vivax
T.living
P.serpens1
P.serpens2
A.deanei1
A.deanei2
C.fascic1
C.fascic2
L.infant1
L.infant2
L.major1
L.major2
B.saltans

```
                 300       310       320       330       340       350       360       370       380       390
T.c.Silvio YTIHQPTAETLTYFDDLMLLTGGRCAYHGTMAKSVEYFESIGFPCPERYTPSDFFMKLLQDPEISKVLVKKWKSYLKHG--VRTPHTTAVELNPNPSES
T.c.Dm28c  ...............................................................................R......................
T.c.CLB.NE ..............................................................................................
T.marink   ...............................................................................H......D.................
T.c.bat    ............H.............................................................................
T.ranAM80  ...........I....I......Q........E.MA......Y........T..Y.T.....DT..I.I....KH.........S..............
T.dionisii ...............................L..............T....N......T...............................
T.b.b.427  ......S.GV.NH.......VR...V.....ED..A......YV...T...T..Y.T.M..SVQA...I.Q..RHV.-R..K..L..RV....HQ.WT.
T.b.gamb   ......S.GV.NH.......VR...V.....ED..A......YV...T...T..Y.T.M..SVQA...I.Q..RHV.-R..K..L..RV....HQ.WT.
T.congol   ......S.GV.KH.......VR.Q.V.....ED..A..Q...YT...T...T..Y.S.M...VS.R..I.Q.RRHI.KR..G..L..RV.A..EQ.GM.
T.evansi   ......S.GV.NH.......VR...V.....ED..A......YV...T...T..Y.T.M..SVQA...I.Q..RHV.-R..K..L..RV....HQ.WT.
T.vivax    ......G.GM.E...........H.V..D..QNV.P.........KTF..T....T.........H.I.E..RH..R...EK.L...P.K...R.ET.
T.living   ...............I...................D......Y...D....T....T.....PT..I.I....K......................
P.serpens1 .........V.SS...I.............P..D.LD.......K......AG.Y.......EQTAAII.ER.EQH..SS..K......SIR.A...N..
P.serpens2 .........V.AS...I.......Y....A.SDALN..D....K......AA.Y..T....EQTAQK..ER.EKH.RSC..D....S.SIRVAMRREN.
A.deanei1  .........V.S....V..M.Q..AI.....DAA.D..AE...V...I.....Y..T.M..YVT....I.R.RVF..K..GR.....A.IRPA.SKAD.
A.deanei2  .........V.S....V..M.Q..AI.....DAA.D..AE...V...I.....Y..T.M..YVT....I.R.RVF..K..GR.....A.IRPA.SKAD.
C.fascic1  .........V.S....V..M.Q..V.......A..G....V.....TK...T.Y..VM...NVT..I.I.R.RK...N...P.S......R.AKAR...
C.fascic2  .........V.S....V..M.Q..V.......A..G..........TK...T.YY.V....NC...I.I.R.RK...N...P.S......R.AKAR...
L.infant1  .........V.S....V..M.Q..I.......A.LD..........SK...T.YY.V....SVT....I.R.RK...N...P.....A..RFAKSR...
L.infant2  .........V.S....V..M.Q..I.......A.LD..........SK...T.YY.V....SVT....I.R.RK...N...P.....A..RFAKSR...
L.major1   .........V.S....V..M.Q..I.......A.LD.......S..SK...T.YY.V....SVT....I.R.RK...N...P.....A..R.AKSRG..
L.major2   .........V.S....V..M.Q..I.......A.LD.......S..SK...T.YY.V....SVT....I.R.RK...N...P.....A..R.AKSRG..
B.saltans  F........V.SF......MAQ.KVVF..ACSAA....S...YT...T...T.Y..T....E..API..QR.DEH.TRHTGD.NTTPIELAHGEDREL.

                 400       410       420       430       440       450       460       470       480       490
T.c.Silvio PTAKNIESYLSMFGSTSCIQFQELFRRFSIDLSRNHVYIFSHFIQAAFFAVIVGLIFLNVKDDLAGMQDREGVFFMVTMNRAMGQTFIMVNSFMQDKAL
T.c.Dm28c  ..............................................................................................
T.c.CLB.NE ..........GR................M.............................................................
T.marink   .......A..DK....T....W..L....V.............M.....SL.....................................H.R..
T.c.bat    ..................G...........................................................................
T.ranAM80  V.V.F..T..DQ.R..PW...E..L...AVG.C..R..L..Q.V......L......I.I...IP.I......I.T.A.........L......M..P.
T.dionisii ...Q...N..DK....TA...W..I..AAVG....R..VL...V...V..L........I..NI..I......M..T.............A..S..P.
T.b.b.427  D...FLHG.IQR.KGSAVS..S..V..DFTE.I..RTF.ITSLF.SLI.SLVA....FG.SS.MT.I......L...VI.......YT.MHR.YDF...
T.b.gamb   D...FLHG.IQR.KGSAVS..S..V..DFTE.I..RTF.ITSLF.SLI.SLVA....FG.SS.MT.I......L...VI.......YT.MHR.YDF...
T.congol   D..TFLQ..IRR.KGNMWT.LS..ML.DFR..VLSR.SWIAC.F..TI.SLLG.......GN.MT.I......I.LIVV..G...PYA.IQH.FRV.P.
T.evansi   D...FLHG.IQR.KGSAVS..S..V..DFTE.I..RTF.ITSLF.SLI.SLVA....FG.SS.MT.I......L...VI.......YT.MHR.YDF...
T.vivax    F..LVLQRHIRS.KGSLWT..S..LV.NIME.LYDRTNLCTV.A..LS.SLLG......LSS..N.I......L...V..HG...A.AEISF.FER...
T.living   S..RF..K.IEK....VF...G..V..SAVE.I.DR.....N.V.......V...........I..I......L..TA.............V..S..P.
P.serpens1 T...FLKL.IRK...SPF..LR.I.I.R.SEVM.DRL..I.LAV.EL..SI.......RIGS.IE.V...K.LL...VT...FSSV..VL.T.YTVRPV
P.serpens2 FAL.FLGL.IKK.K.SVY..LN.V.I.RFNE.R.DR.F.LALIV.SLY.SL.A....IRIGM.TTSI.....LLY.AIS..L..SIYAILSL.HRARVI
A.deanei1  ....FL.G.INK...SPMV..I...K.STVEMI.DKL.L...AS..I..S.V.....V.M.NSVT.V...Q.ML..TV...C.SAC...I.A.YNIR.V
A.deanei2  ....FL.G.I.K...SPVV..I...K.ST.EMI.DKL.L...AS..I....V.....V.M.NSVT.I...Q.ML..TV...C..AC...L.A.YNIR.V
C.fascic1  SA..YLDA.IKK...SPP...Y..V..TT.EI..DSL.....AT..L...IV......HMR.NVE.I.....ML..TV......PA...I.A.NNIR.V
C.fascic2  SA.EYLDA.IKK...SPP...Y..T..SA.E...DNL...A.AS..L...IV......H.R.NVE.......ML..AV......PA...L.A.NNIR.V
L.infant1  SA.RFLDA.IVK...SPAV.LY..T..RMMEI..DSL.L..YTA..I...AV........RANVE.I...Q..L.LIV...V.SS....I.T.NNVR.V
L.infant2  SA.RFLDA.IVK...SPAV.LY..T..TMMEI..DSL.L..YTA..I...AV........RANVE.I...Q..L..TV.....SS....I.T.NNVR.V
L.major1   SA.RFLDA.IAK...SPAV.LY..T..TMTEI..DYL.L..YMA..I...IV........RANVE.I...Q..L..TV.....SS....I.T.NNVR.V
L.major2   SA.RFLDA.IAK...SPAV.LY..T..TMTEI..DYL.L..YMA..I...IV........RANVE.I...Q..L..TV.....SS....I.T.NNVR.V
B.saltans  S.LAFMKK.VNKK...IT..A...TY.AFSQVL..KM.L.MTIV..L..GL.A.....RLGH.VQS....I..L...VA...FSTAMG.I.T.PR...V

                 500       510       520       530       540       550       560       570       580       590
T.c.Silvio YVREQMVGSYSPFIFFLSKTLVFFPMRVFFALLECCILYWMVGLYRQAGAFFYYFAVIALLTEVASGLGFAIGATFKSLVVASGTAPVILLPLAMVGGL
T.c.Dm28c  ..............................................................................................
T.c.CLB.NE ............................F.................................................................
T.marink   ............................MV..F...........F.................................................
T.c.bat    ......................S.......F...............................................................
T.ranAM80  .............MY..TRN..........C...SS.......F.HD.........AL......S.....FLS.S.NR.I...S.V...V...SLA...
T.dionisii .............MY...R...........S.V..S.V.....F...........G..T...............S.DN......V.........LA...
T.b.b.427  .I...Q....P.LLYL....I..T.Y.LL.C.V..AVV.......AS.....TFY.A....S...AS...LLS..CSTS.G.T.F..IV....TL....
T.b.gamb   .I...Q....P.LLYL....I..T.Y.LL.C.V..AVV.......AS.....TFY.A....S...AS...LLS..CSTS.G.T.F..IV....TL....
T.congol   .I...H....P.ILYHV..VI..T.H.M....I..S.I..L....AN..T..TFY.A....S...ASY..MLS.ALS.TTS.T.F..IV.I..TL....
T.evansi   .I...Q....P.LLYL....I..T.Y.LL.C.V..AVV.......AS.....TFY.A....S...AS...LLS..CSTS.G.T.F..IV....TL....
T.vivax    FI...QS.T.P.IVYLIAR...WT.Y.LL.I.M.SF...YLS....S.E...I.A..VG.....SGT..LLF..FLG.S.S.V.A..L....FSLA...
T.living   .I...L......LLY...R........I..S.I..S........V..P.P.....G..T..................D.......LV...V....LA...
P.serpens1 FM...NA.A...LVY.IGTMTAQA.SMI..CF...I.I.FLT..HVS.....M..LIQV..Q..GV....LLS.C.E..T...SI..L.IV..NVA...
P.serpens2 FLN..NS.A.....Y.IGTVSAQL.FL..LCFV.SA.I.FLT...ASV....T..S.MVMFQD.CV.I.ILLS.C.E..TL.TTMVAL.N..FIYAS.I
A.deanei1  .T...QAAC...GMYL.ARS.A....KI..VIV..L...F....AKDP.......G....ES..GQAF..MLS.LLP..I...AIV.L......LA...
A.deanei2  .T...QAAC...GMYL.ARS.A....KI..VIV..V...F....AKDP.......G....VS..GLAF..MVSSLLP..I...AIV.L......LA...
C.fascic1  .T...QA.A...AMY.VGRSVA...LQI..IIV...V.......H.KP.S.....G....VSQ..T.F....STS.PT..M..AIT.L....MS.A...
C.fascic2  .T...QA.A...LM...GRSIA....QI..IMV..A.M...T..H.TP.N.....G..SMVSQ..T......S.S.P..MI..AMT.L.......A...
L.infant1  FM...QA.A...LM...GRSFA...VQILAV.V.S.........H.HP.S.....G.....SQ..T......STSCP....S.AM.S.SFML.SVG...
L.infant2  FM...QA.A...LM...GRSFA...VQILAV.V.S.........H.HP.S.....G.....SQ..T......STSCP....S.AM..L..I...LG...
L.major1   FM...QA.A...LM...GRSFA...VQILAV.V.S.........H.HP.S.....G.....SQ..T......S.SCP.V..S.AL..LV.I...LG...
L.major2   FM...QA.A...LM...GRSFA...VQILAV.V.S.........H.HP.S.....G.....SQ..T......S.SCP.V..S.AL.S.S.MV.YLG...
B.saltans  FI...QAAA...LLYYI..YVS.L.VQLLGSM..AVLV.F.ARFHQS..........ATMVSQ.SG......S.SVD.F...A.L..LAIV..M.AA..
```



Sítio de ligação a ATP; Walker A; Walker B; Assinatura ABC; Regiões transmembrânicas.

Figura 56: Alinhamento das sequências proteicas de ABCG1 entre os organismos.

4.4.4.4 Reconstrução de genealogias

Foram obtidas as árvores filogenéticas da NTR (Figura 57), OYE (Figura 58), FeSOD-A (Figura 59) e ABCG1 (Figura 60) dos tripanossomatídeos estudados.

Na árvore de NTR não são observados eventos de duplicação de genes. A árvore é compatível com o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por outros marcadores moleculares clássicos como gGAPDH e SSU rRNA. Infere-se que *S. galati*, *A. deanei* e *P. serpens* sofreram mais mutações do que os demais tripanossomatídeos, talvez por *Angomonas* e *Strigomonas* terem endossimbiontes bacterianos e *Phytomonas* ser heteroxênica de inseto fitófago e plantas.

A árvore de OYE não segue o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por outros marcadores moleculares clássicos como gGAPDH e SSU rRNA. De maneira geral não há evolução em concerto para este gene, porém, em *S. galati* pode estar ocorrendo evolução em concerto em escala menor nas cópias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e nas cópias 7, 8, 9 e 10. Em *A. deanei* e em *C. fasciculata* não está ocorrendo evolução em concerto. Não foram encontradas as sequencias de OYE em *P. serpens* e em tripanossomas africanos.

A árvore do transportador ABCG1 é compatível com o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por outros marcadores moleculares clássicos. Nos tripanossomatídeos não pertencentes ao gênero *Trypanosoma* infere-se a presença de parálogos, possivelmente por uma evolução em concerto. As duas cópias de ABCG1 de *P. serpens* apresentam taxas de mutação diferente.

A árvore de FeSOD-A segue o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por outros marcadores moleculares. Os parálogos de *A. deanei* e de *B. saltans* apresentam evolução em concerto. A hipótese mais parsimoniosa é que estas duplicações ocorreram em eventos individuais.

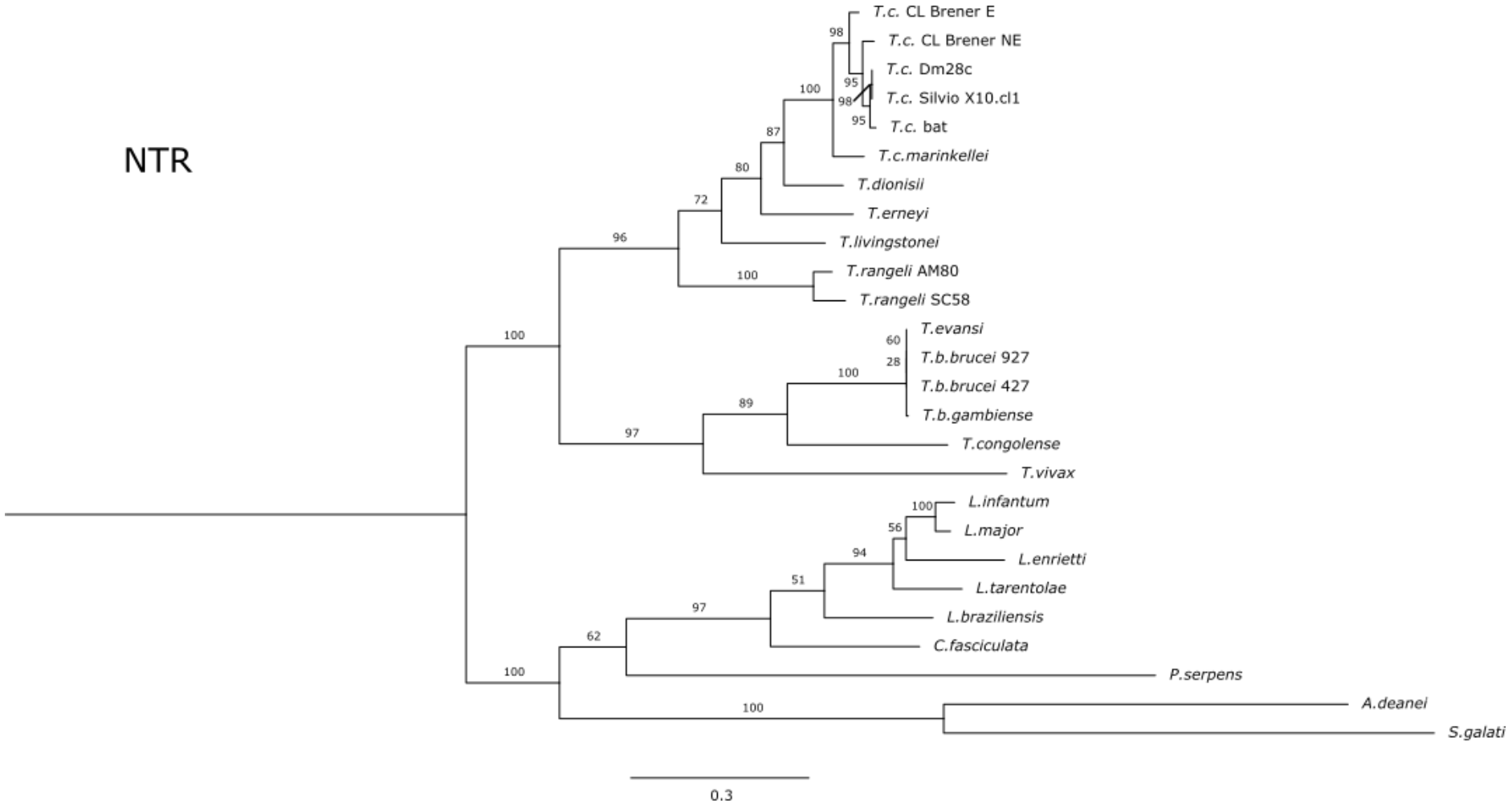


Figura 57: Árvore por estimação de máxima verossimilhança de NTR.

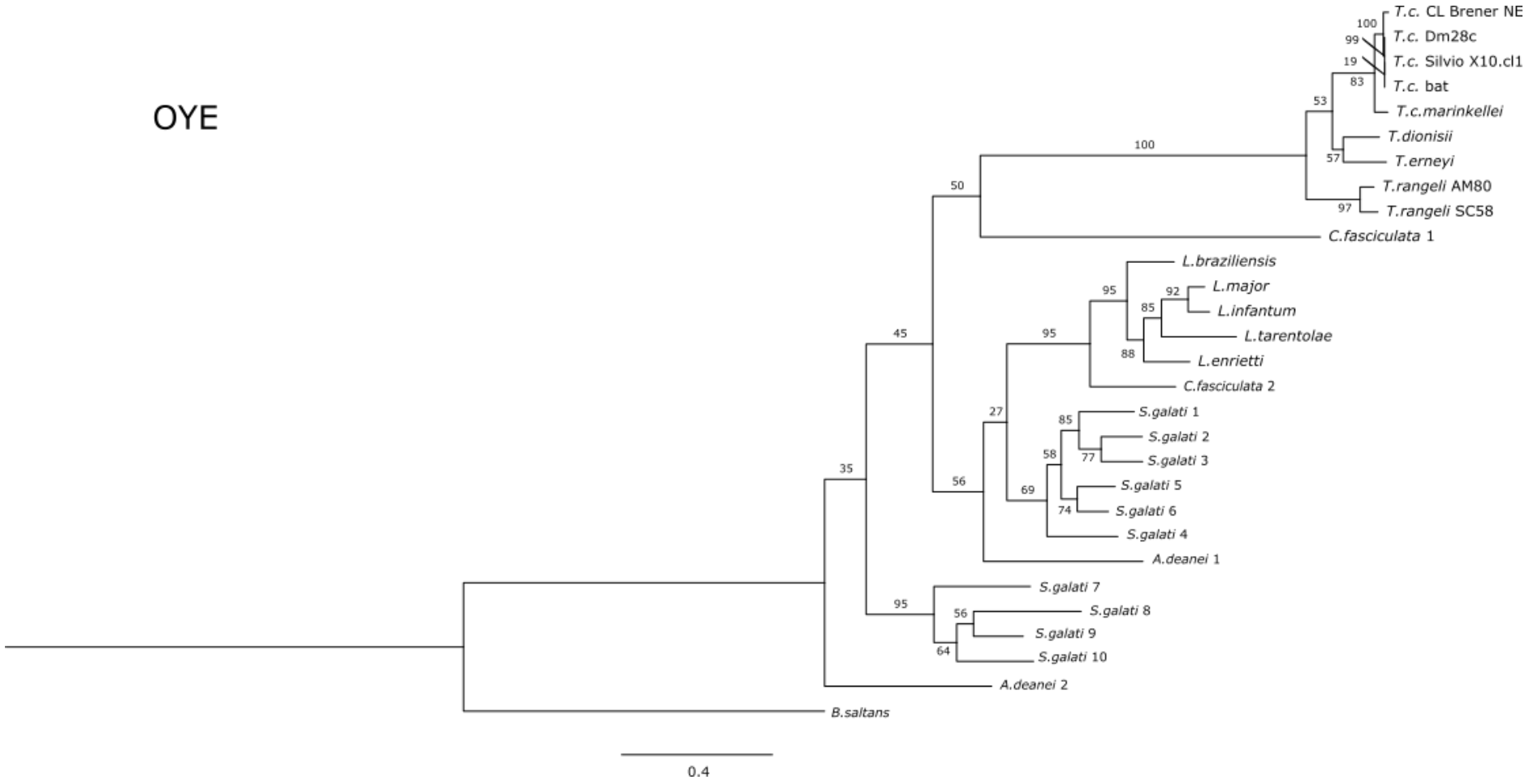


Figura 58: Árvore por estimação de máxima verossimilhança de OYE.

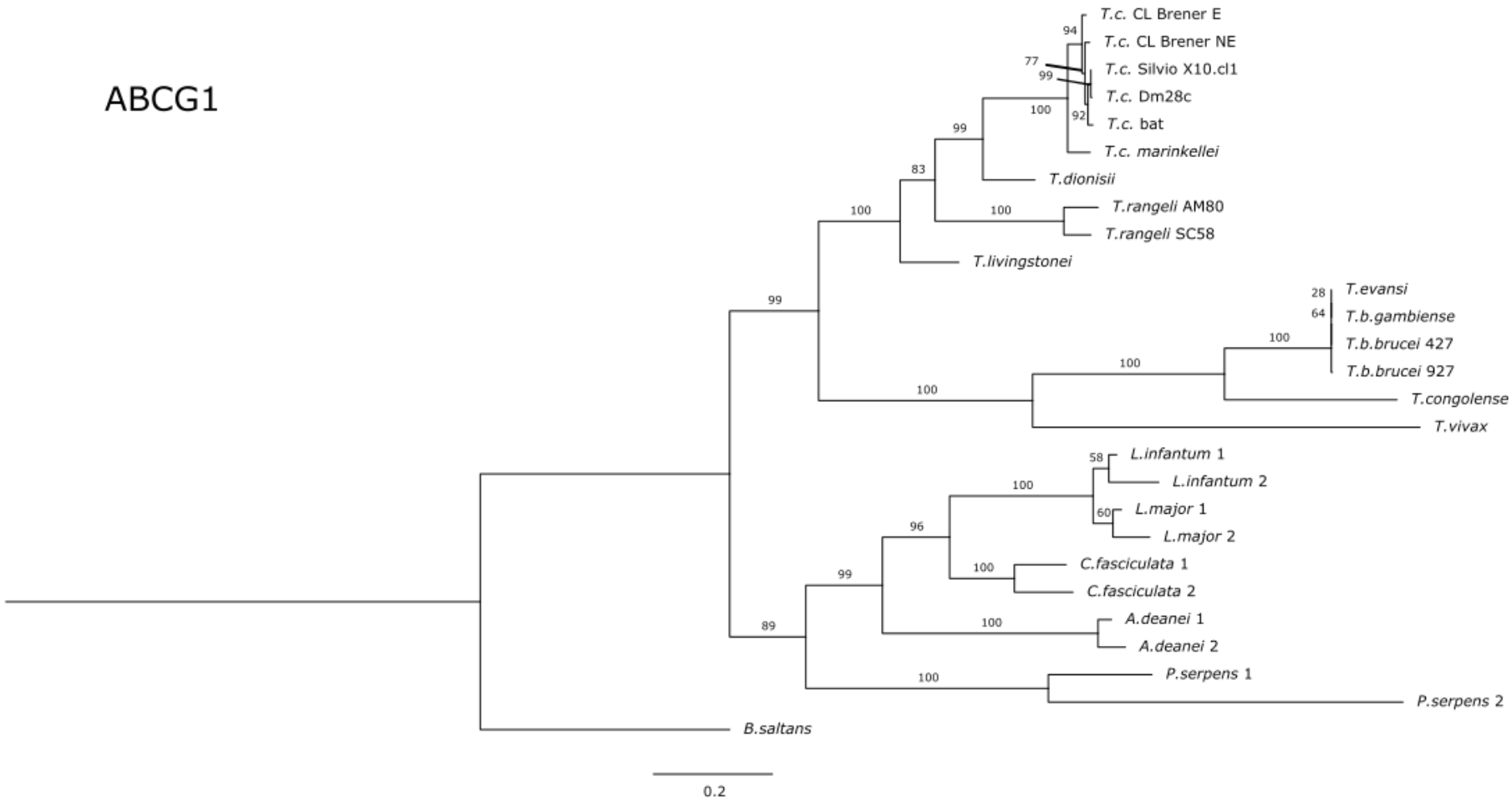


Figura 60: Árvore por estimação de máxima verossimilhança de ABCG1.

5 DISCUSSÃO

A busca de novos compostos para o tratamento da DC é uma das prioridades em pesquisa, conforme justificado anteriormente. Aqui foi investigada a atividade tripanocida de derivados da Quinazolina e do Oxadiazol, sintetizados no laboratório da Prof.a D.ra Iolanda M. Cuccovia (IQ-USP). Esses compostos haviam apresentado atividade antibacteriana, o que justificava ensaiá-los contra o *T. cruzi*. Além disto, como relatado na Introdução, análogos da quinazolina-2,4,6-triamina e alguns derivados do oxadiazol haviam mostrado citotoxicidade para *T. cruzi (*MENDOZA-MARTÍNEZ et al. 2015; ISHII et al. 2011; SANTOS FILHO et al. 2009).

Nesse estudo, foi avaliada a atividade de quatro derivados de 6,7-dimetoxiquinazolina e de quatro derivados de 1,3,4-oxadiazol contra formas epimastigotas de duas cepas do *T. cruzi*: Silvio X10.cl1 e Colombiana, ambas pertencem à DTU TcI. Essas cepas foram escolhidas uma vez que, em modelo murino, a cepa Silvio X10.cl1 foi considerada sensível e a cepa Colombiana, resistente a BZ e NFX (FILARDI; BRENER, 1987).

Tendo em vista que formas epimastigotas podem ser cultivadas em duas formulações de meio LIT, LIT-He e LIT-Hb, que apresentam diferenças nas concentrações de nutrientes (triptose e glicose) e de sais e que são suplementados, respectivamente, com hemina ou hemoglobina (ver APÊNDICE A), decidiu-se verificar o efeito da composição do meio de cultura sobre a atividade anti-*T. cruzi* dos compostos. A varredura inicial foi feita utilizando os compostos na concentração única de 10 µM, uma vez que, nas condições de ensaio utilizadas, a CI_{50} de NFX e de BZ é desta ordem de grandeza.

O primeiro aspecto que chamou a atenção foi o fato de 10 µM de NFX promover taxas de inibição do crescimento de Silvio X10.cl1 semelhantes nos meios LIT-He e LIT-Hb, respectivamente, 48,39% e 43,37%. Por outro lado, para a cepa Colombiana, a inibição do crescimento foi de 32,72% (meio LIT-He) e 56,92% (meio LIT-Hb). Com base nesses dados, Silvio seria mais sensível a NFX que Colombiana, quando ensaiada no meio LIT-He, e mais resistente a NFX, quando ensaiada no meio LIT-Hb.

Também foram detectadas diferenças na atividade dos compostos nos dois meios de cultura. Por exemplo, o derivado de Oxadiazol SNR-03-06, na concentração de 10 µM, inibe o crescimento da cepa Colombiana em 2,52% e 39,49% nos meios LIT-He e LIT-Hb,

respectivamente. Por outro lado, o mesmo composto inibe o crescimento da cepa Silvio em cerca de 8% nos dois meios de cultura.

A análise do conjunto de dados sugere que a formulação do meio LIT influi na definição da atividade de compostos anti-*T. cruzi*, tanto em aspectos quantitativos (% de inibição do crescimento), quanto em aspectos qualitativos (comparação de sensibilidade entre cepas). Desta forma, recomenda-se não comparar valores absolutos de CI_{50} de um determinado composto cuja atividade foi avaliada em meios de cultura e condições experimentais diferentes.

Uma possível explicação para estas observações seria haver diferenças nas taxas de crescimento das cepas nos dois meios de cultura. De fato, verificou-se que a cultura controle da cepa Silvio X10.cl1, após 72h de incubação a 28 °C no meio LIT-He atinge a densidade de 121,1 x 10^6 parasitos/mL, ao passo que, no meio LIT-Hb, a densidade é de 30,9 x 10^6 parasitos/mL. Já a cepa Colombiana, nas mesmas condições de cultivo, atinge 72,6 x 10^6 parasitos/mL e 39,0 x 10^6 parasitos/mL, respectivamente, em LIT-He e LIT-Hb. A determinação do tempo de geração das cepas indicou que no meio LIT-Hb as formas epimastigotas apresentam um TG maior do que no meio LIT-He, o que é condizente com o fato de o meio LIT-Hb ser mais pobre em nutrientes (ver APÊNDICE A). Tendo em vista que, em termos gerais, os compostos apresentam maior efeito inibitório no meio de cultura mais pobre (LIT-Hb), pode haver uma relação entre o tempo de geração do parasito, suas características metabólicas e o efeito inibitório do composto. Por outro lado, não pode ser descartada a possibilidade da interação de certos compostos com componentes do meio de cultura.

Entre os compostos avaliados, apenas o derivado de quinazolina SNR-02-03 apresentou atividade inibitória apreciável para ambas as cepas, na concentração de 10 μM. Isto propiciou que fosse determinado o valor de sua CI_{50}, que foi de 14,5 ± 1,7 μM (Silvio X10.cl1) e 13,7 ± 0,9 μM (Colombiana) no meio LIT-He. Os valores da CI_{50} de SNR-02-03 seriam da mesma ordem de grandeza da CI_{50} de NFX. Utilizando a mesma abordagem experimental, Palace-Berl et al. (2015) reportaram uma CI_{50} de 6,02 ± 0,32 μM NFX para Silvio X10.cl1 em meio LIT-Hb. Embora SNR-02-03 apresente uma atividade tripanocida promissora, foi comprovado que ele exibe elevada citotoxicidade para as células de mamífero em cultura, impossibilitando seu uso como tal.

Na tentativa de identificar fatores responsáveis pela ausência de atividade tripanocida da maior parte dos compostos avaliados, foram determinados *in silico* seus valores

de CLogP. Este parâmetro indica a tendência preferencial do composto de dissolver-se em uma fase oleosa (lipossolubilidade) ou aquosa (hidrossolubilidade). Verificou-se que os compostos SNR-02-02, SNR-02-06 e SNR-03-01 apresentam valores de CLogP na faixa de 1,2 a 1,9, indicando maior grau de hidrofilicidade e, portanto, dificuldade de permeação por membranas biológicas. Por outro lado, os compostos SNR-02-03, SNR-02-04, SNR-02-05, SNR-03-02 e SNR-03-06 apresentam valores de CLogP entre 3,5 e 4,2, indicando facilidade de permear membranas biológicas. Desses compostos, apenas SNR-02-03 mostrou atividade tripanocida promissora, indicando que outros fatores, além de sua capacidade potencial de penetrar na célula, determinam seu modo de ação.

Por apresentar atividade anti-*T. cruzi* poderá ser de interesse de outros grupos de pesquisa introduzir modificações químicas no composto SNR-02-03 visando eliminar a citotoxicidade para células de mamífero e aumentar sua atividade tripanocida.

O entendimento dos mecanismos ou dos elementos que determinam a resistência natural de cepas do *T. cruzi* aos fármacos disponíveis para o tratamento da DC é relevante, não apenas com vistas a tentar intervenções para tornar mais eficaz o tratamento existente, como também visando a implementação de novos fármacos que vierem a ser descobertos.

Na Introdução desta dissertação foram relatados trabalhos que demonstram a resistência natural de cepas do *T. cruzi* a BZ e NFX (FILARDI; BRENER, 1987; MURTA et at. 1998; DE ORNELAS TOLEDO et al. 2003). Também foram descritos ensaios clínicos que indicam as falhas terapêuticas destes fármacos no tratamento da DC (URBINA, 2010; YUN et al. 2009). Falhas terapêuticas do posaconazol, um fármaco promissor para a DC, foram evidenciadas no ensaio clínico realizado com pacientes em Barcelona (Espanha) (MOLINA et al. 2014). Este resultado confirma dados *in vitro* que mostram uma atividade variável, cepa-específica, de inibidores da biossíntese de ergosterol (posaconazol, ravuconazol, EPL-BS967 e EPL-BS1246) contra amastigotas intracelulares (MORAES et al. 2014).

Um levantamento da literatura mostrou que a atividade citotóxica do BZ e NFX foi avaliada em alguns tripanossomatídeos. Mostrou ainda que alguns parasitos, dentre os quais *Leishmania (L.) donovani* (NEAL; CROFT, 1984), tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* (BAKER; SELDEN, 1981; CERIDÓREO CORRÊA et al. 2011), *Crithidia fasciculata* (GUTTERIDGE et al. 1982) e *Trypanosoma lewisi* (DESQUESNES et al. 2016) apresentavam resistência a BZ ou sensibilidade apenas a doses elevadas do fármaco. Isto induziu a facção da análise a sensibilidade a BZ em algumas espécies da família

Trypanosomatidae e em representantes do gênero *Trypanosoma*, com o objetivo de verificar se havia um padrão fenotípico grupo-específico.

Para a análise da sensibilidade a BZ, utilizou-se uma abordagem sistemática, definindo previamente, para cada espécie, as condições ótimas de cultivo e o tempo de geração (TG) do organismo. Essas condições foram ajustadas, uma vez que a sensibilidade a BZ seria avaliada após 72h de incubação com o fármaco em culturas em fase exponencial de crescimento. Para a maior parte dos organismos o TG foi da ordem de 22 a 24h. Porém, para algumas espécies, o TG foi menor, da ordem de 15h, para *T. c. marinkellei* e *T. b. brucei*, ou bem maior, da ordem de 40h, no caso de *L. (V.) braziliensis*. Verificou-se que nas culturas de alguns parasitos (*T. c. marinkellei, T. dionisii, L. (L.) infantum, L. (V.) braziliensis, L. (L.) tarentolae, L. (L.) enriettii, C. fasciculata, A. deanei, S. galati* e *Paratrypanosoma* sp.) havia a formação de rosetas, o que dificultaria a contagem dos mesmos nos ensaios de sensibilidade a BZ ou a aplicação do método da variação da turbidez da cultura utilizado no Subprojeto 1.

Assim, para avaliar a sensibilidade a BZ dos organismos, foi utilizado o ensaio do MTT. Uma vez que nosso objetivo era expressar esta característica na forma de valores de CI_{50}, parâmetro que define a concentração do fármaco que inibe 50% do crescimento da cultura, foi necessário determinar a correlação entre a densidade dos organismos e a produção de formazan. Deve ser lembrado que o ensaio do MTT avalia a viabilidade celular, a partir da atividade de desidrogenases. É reconhecido que os tripanossomatídeos apresentam grandes diferenças metabólicas (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006), cujas vias puderam ser reconstruídas com o auxílio de análises transcriptômicas e proteômicas. Os estágios de inseto de várias espécies de tripanossomatídeos podem ser mantidos *in vitro* em meios contendo excesso de glicose e de aminoácidos, fontes utilizadas para a produção de ATP. Nestas condições, os compostos são convertidos em produtos finais parcialmente oxidados pela chamada fermentação aeróbica. Os estágios do inseto de algumas espécies, tais como *T. brucei*, *T. cruzi* e *Crithidia* sp., preferem consumir glicose a aminoácidos, ao contrário de *Leishmania* sp. Em *Phytomonas*, várias funções mitocondriais, incluindo a respiração mediada por citocromos, a produção de ATP mitocondrial e o ciclo de Krebs, inexistem e a produção de energia depende predominantemente da glicólise (NAWATHEAN; MASLOV, 2000; JASKOVSKA et al. 2015). Um aspecto que pode ter facilitado a perda dos citocromos em *P. serpens* é o hábito alimentar dos insetos transmissores que se nutrem exclusivamente da seiva da planta, rica em carboidratos (PORCEL et al. 2014). Essas diferenças do metabolismo são corroboradas pela equação da reta que correlaciona o número de parasitos e a absorbância

do formazan produzido no ensaio do MTT (Tabela 17) e que sugere intensa atividade desidrogenásica em *L. (L.) infantum e L. (V.) braziliensis*, ao contrário do que se verifica nos demais parasitos.

Nos ensaios iniciais para a determinação da CI_{50} para BZ, a concentração do fármaco variou de 0 a 80 µM. Para organismos que apresentaram resistência a 40 µM de BZ, a concentração do fármaco variou de 0 a 160 µM. Com essa abordagem foi possível verificar a elevada sensibilidade a BZ em *T. cruzi, T. c. marinkellei, T. rangeli* e *P. serpens*, com valores de CI_{50} para BZ que variaram de 3 a 14 µM. *T. b. brucei* apresentou uma maior resistência com CI_{50} de cerca 25 µM. A sensibilidade a BZ aqui observada para formas procíclicas de *T. b. brucei* corrobora dados anteriores que mostram sensibilidade ao fármaco em formas sanguíneas do parasito (PRATHALINGHAM et al. 2007; WILKINSON et al. 2008; SOKOLOVA et al. 2010). Para *T. c. marinkellei, T. rangeli* e *P. serpens*, diante da ausência de pesquisas relacionadas encontradas nas buscas, a sensibilidade a BZ não foi avaliada anteriormente.

Foi surpreendente verificar a total resistência de *T. dionisii* a 80 µM de BZ. Uma possível explicação para este fato é que esta característica seja própria do isolado investigado (TCC 211), obtido de morcego da espécie *Eptesicus brasiliensis* (LIMA et al. 2012). Baker e Selden (1981) verificaram que 38 µM BZ inibe o crescimento intracelular de um isolado de *T. dionisii* (P2), obtido de morcego da espécie *Pipistrellus pipistrellus* na Inglaterra. A comparação da região V7V8 do gene SSU rRNA indica haver cerca de 2% de divergência entre os isolados brasileiros de *T. dionisii* e os europeus (LIMA et al. 2012). Com isto, a sensibilidade a BZ de outros isolados de *T. dionisii* deverá ser investigada no futuro. Por outro lado, resistência a BZ foi relatada na infecção experimental com um isolado de *T. lewisi* obtido de um rato silvestre na Tailândia (DESQUESNES et al. 2016). Tomadas em conjunto, as evidências existentes sugerem que a sensibilidade a BZ deverá ser investigada em outros representantes do clado *Trypanosoma* e em mais de um isolado da mesma espécie.

Nesse estudo foi detectada a resistência natural à concentração de 40 µM de BZ em isolados dos gêneros *Crithidia, Angomonas, Strigomonas* e *Leishmania.* Para isolados de *C. fasciculata, A. deanei* e *S. galati* a inibição do crescimento promovida por 160 µM de BZ é da ordem de 20% (Tabela 20). Nos representantes do gênero *Leishmania*, a maior resistência a BZ foi observada nos isolados de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) enriettii*, nos quais 160 µM

de BZ inibiu cerca de 15%. Para os isolados de *L. (L.) infantum* e de *L. (L.) tarentolae*, na mesma concentração, a inibição foi de 50%.

O conjunto dos resultados demonstra evidente divisão dos parasitos em dois grupos: um grupo que apresenta sensibilidade a baixas concentrações de BZ e um grupo, com resistência natural.

Essas informações são adicionadas na Figura 61, que reproduz o cladograma apresentado na Figura 20, o qual ilustra o consenso atual das relações filogenéticas de Kinetoplastídeos.

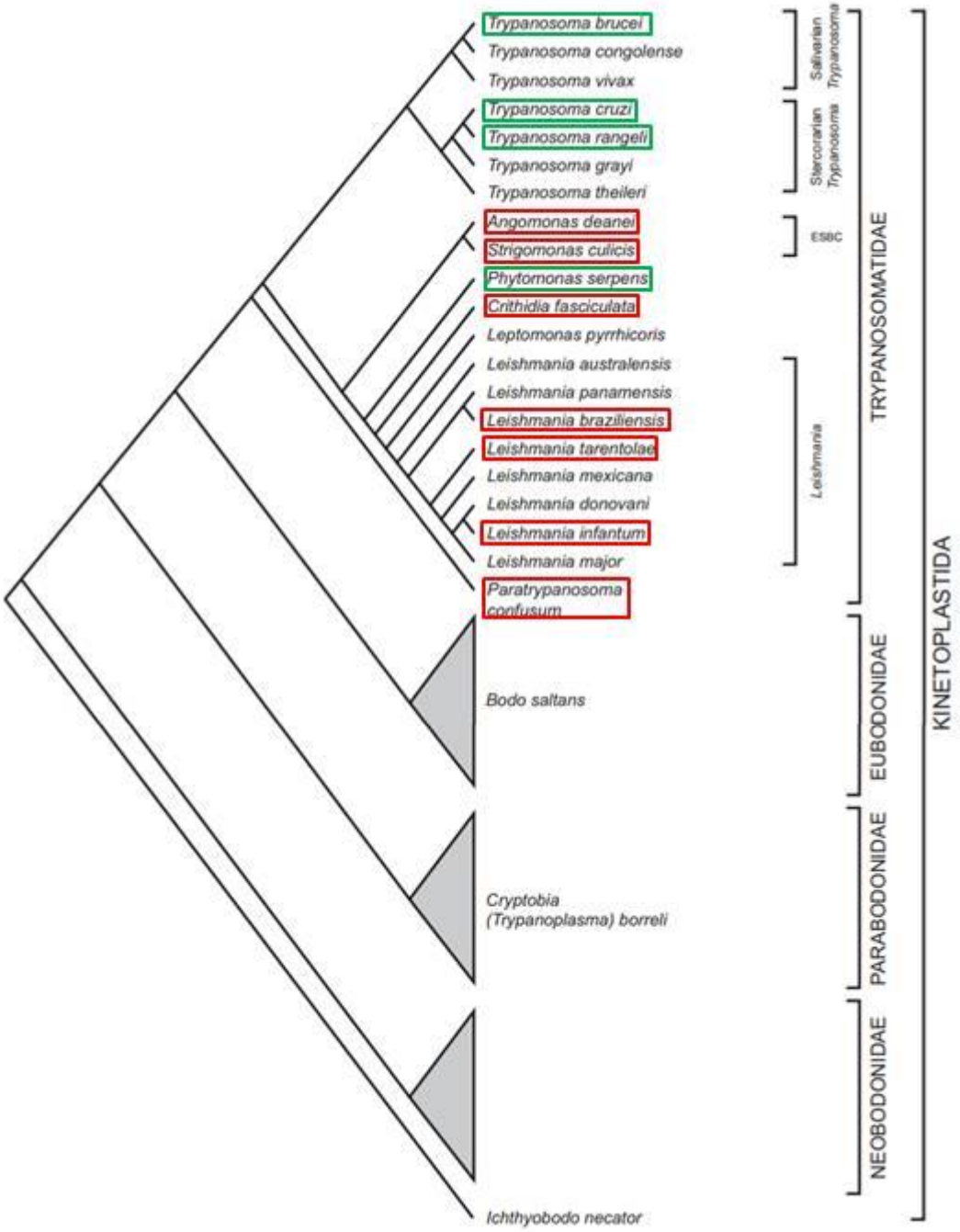


Figura 61: Cladograma que ilustra o consenso atual das relações filogenéticas de Kinetoplastídeos. Figura adaptada de Jackson (2015). Os retângulos indicam algumas das espécies cuja sensibilidade a BZ foi investigada. Em verde, os parasitos sensíveis a BZ e em vermelho, os que apresentam resistência natural ao fármaco.

Tendo por objetivo obter informações sobre a possível origem da resistência/sensibilidade a BZ, decidiu-se avaliar a sensibilidade ao fármaco em um isolado de *Paratrypanosoma*. Um tripanossomatídeo pertencente a este gênero, denominado *P. confusum*, foi descrito pelo grupo do Prof. Julius Lukes em 2013, após seu isolamento do mosquito *Culex pipiens* (FLEGONTOV et al. 2013). Filogenias baseadas na análise de proteínas individuais ou de segmentos concatenados indicam que *P. confusum* se localiza na base da família Trypanosomatidae, com suporte muito elevado (ver Figura 61). Nesse estudo foi utilizado um isolado de *Paratrypanosoma* obtido de um percevejo no Panamá. Nos ensaios, verificou-se que este isolado apresenta resistência elevada a 40 µM de BZ, que inibe apenas 30% do crescimento da cultura. A inibição aumenta gradualmente, atingindo-se uma inibição da ordem de 70% na concentração de 160 µM de BZ. Isto sugeriria um comportamento intermediário entre as espécies sensíveis e as espécies notadamente resistentes a BZ.

Tendo em vista que representantes dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são agentes patogênicos para humanos, buscou-se explorar um dos possíveis fatores que poderiam influir na resistência a BZ verificada em Leishmanias. Foi comparada a taxa de captação do fármaco em *L. (L.) infantum* e em *T. cruzi*. Verificou-se que, após 2h de incubação, *T. cruzi* incorpora cerca de 6 nmoles de BZ (a partir de uma concentração de 50 µM no meio), ao passo que apenas 1,2 nmoles de BZ são captados por em *L. (L.) infantum* (a partir de uma concentração de 100 µM no meio). Esta diferença marcante poderia explicar, pelo menos em parte, a resistência de Leishmanias ao fármaco. Na literatura não foram encontradas referências sobre o processo de internalização de BZ em *T. cruzi*. Por analogia ao observado para NFX, é possível que BZ seja interiorizado por difusão passiva ou por difusão facilitada através da membrana do parasito (TSUHAKO et al. 1991; BOIANI et al. 2010). Assim, diferenças na composição da membrana de membros dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* poderiam ser responsáveis pelas diferenças de captação de BZ.

A resistência a BZ verificada para formas promastigotas de espécies de *Leishmania* apoia relato anterior que indica que BZ, na concentração de 97 µM, promove uma inibição de apenas 36% do crescimento de formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*, ao passo que NFX, na mesma concentração, inibe cerca de 80% (NEAL; CROFT, 1984). Por outro lado, NFX mostrou ser pouco eficiente no tratamento de pacientes com leishmaniose mucocutânea (MARSDEN et al. 1979).

Foi possível verificar a sensibilidade de *P. serpens* a BZ. Isto porque esta espécie, de acordo com o cladograma apresentado na Figura 61, está localizada próxima a espécies que apresentam resistência a BZ. *Phytomonas* constitui um grupo de parasitos com ampla distribuição geográfica e que tem sido isolado de inúmeras espécies de vegetais do grupo Angiosperma. Nestes vegetais, *Phytomonas* podem ser encontradas no floema, dutos de látex, frutos, flores e sementes. Os primeiros genomas publicados foram os de *P. serpens* 9T, isolado do fruto do tomateiro; *Phytomonas* sp. HART1, isolado do floema de um coqueiro; e *Phytomonas* EM1, isolado do látex de *Euphorbia* (revisto em JASKOWSKA et al. 2015). Com base na sequência de cerca de 1000 genes nucleares de cópia única obtidos nestes genomas, foi construída a árvore mostrada na Figura 62 que ilustra as relações evolucionárias entre as espécies sequenciadas de *Phytomonas* e os taxa de *Leishmania* e *Trypanosoma* patogênicos e não patogênicos. Observa-se a proximidade dos clados *Phytomonas* e *Leishmania*, que, porém, apresentam suscetibilidades a BZ divergentes.

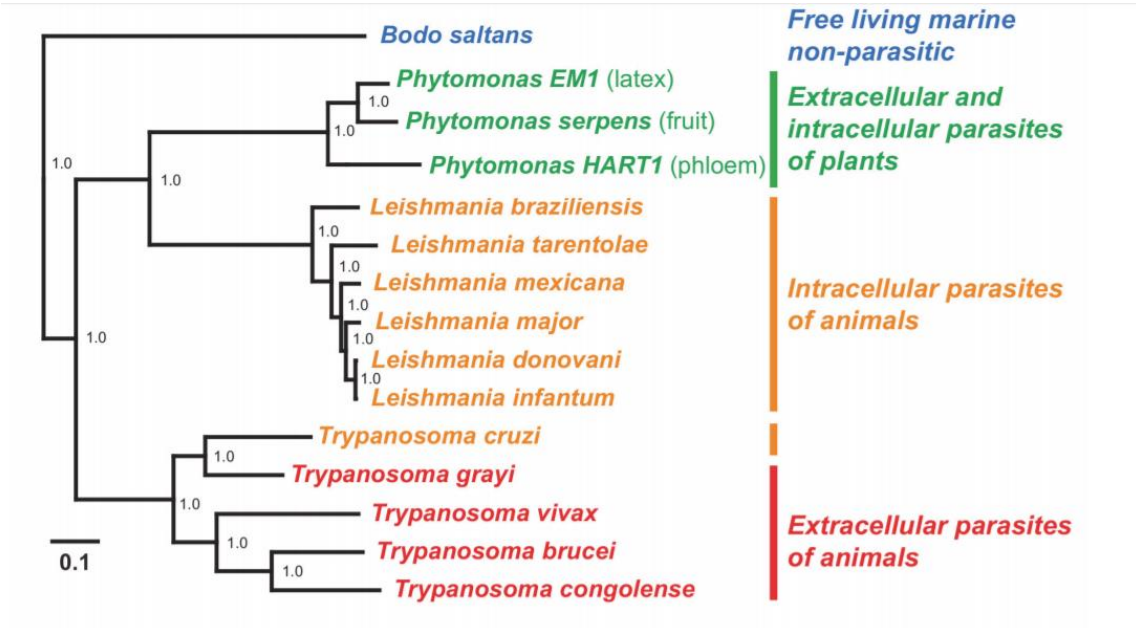


Figura 62: Árvore de Máxima Verossimilhança, baseada em sequências de proteínas, mostrando a filogenia de tripanosomatídeos (JASKOWSKA et al. 2015)

Visando elucidar a origem da sensibilidade de *Phytomonas* a BZ, foi analisada a taxa de captação do fármaco em *P. serpens* e verificou-se ser igual à taxa de captação de *T. cruzi*. Até o momento, poucos componentes da superfície celular de *Phytomonas* foram

caracterizados. A partir de dados genômicos, infere-se a presença da glicoproteína gp63, de cisteína proteinases, de glicolípidios e de outros componentes ubíquos em tripanossomatídeos (JASKOWSKA et al. 2015). Semelhanças imunogênicas entre *P. serpens* e *T. cruzi* foram mostradas, pois a exposição de camundongos C57BL/6 a *P. serpens* atenua os sintomas da doença de Chagas experimental (DA SILVA et al. 2013). A análise proteômica de componentes da superfície de *Phytomonas*, *Leishmania* e *Trypanosoma* poderá elucidar os elementos moleculares envolvidos nas semelhanças imunogênicas entre os organismos.

Para obter elementos que pudessem justificar as diferenças de sensibilidade a BZ nos parasitos estudados, foram analisadas *in silico* algumas características de quatro proteínas que foram associadas com a sensibilidade/resistência a BZ em *T. cruzi*: três enzimas, NTR, OYE e FeSOD-A, implicadas na resistência obtida por pressão seletiva, e o transportador ABCG1, que participaria da resistência natural. Utilizando a abordagem descrita em Materiais e Métodos, foram descritas as sequências aceitas das quatro proteínas. Verificou-se variação no número de sequências de cada proteína para diferentes espécies. Com essas sequências foram realizadas análises filogenéticas. A seguir, serão comentadas algumas características observadas.

Para a NTR I de *T. cruzi* foi descrito um gene de cópia única por genoma haplóide. Neste estudo, foi aceita uma sequência da NTR I para cada organismo. Não foi identificada nenhuma sequência em *B. saltans*. Tendo em vista que a sequência da NTR I teria origem bacteriana, é possível que a transferência deste gene ainda não tivesse ocorrido em *Bodo*. No futuro, quando os dados do genoma estiverem completados, será interessante investigar este aspecto em *Paratrypanosoma*.

Verificou-se um grau de identidade elevado entre as sequências proteicas aceitas da NTR dos organismos e que a árvore da NTR é compatível com o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por marcadores moleculares clássicos.

É pertinente comentar que duas NTRs foram descritas em *Leishmania*. Uma NTR de tipo I, homóloga da *Tc*NTR, capaz de ativar *in vitro* NFX, nitrofurazona e fexinidazol (a atividade sobre BZ não foi investigada) e essencial para a sobrevivência de promastigotas de *L. (L.) donovani* (WYLLIE; PATTERSON; FAIRLAMB, 2013) e uma NTR2 (GeneDB: LinJ.12.0730), envolvida na bio-ativação dos nitro compostos bicíclicos (R)-PA-824, DNDIVL-2098 e Delamanid, este, um fármaco usado no tratamento da tuberculose resistente a drogas (WYLLIE et al. 2016). NTR2 é capaz de ativar *in vitro* também NFX, mas apresenta baixa atividade para fexinidazol. Os autores reportam não haver nenhuma enzima equivalente

no genoma de *T. brucei*, o que explicaria a baixa atividade de nitro compostos bicíclicos nesses parasitos. Não foram encontrados homólogos da NTR2 em outros representantes do gênero *Trypanosoma*, ao contrário do observado em *A. deanei* e *S. culicis*, cuja enzima apresenta cerca 60% de identidade com a NTR2 de *L. (L.) infantum* e de *L. (L.) donovani*.

Para *T. cruzi* foram descritas alterações do número de cópias gênicas e mutações no gene da *Tc*NTR em isolados cuja resistência a BZ foi selecionada *in vitro* (WILKINSON et al. 2008; MEJIA et al. 2012). Por outro lado, não foram observadas alterações desse gene em isolados naturalmente resistentes (MEJIA et al. 2012). A NTR I dos parasitos resistentes a BZ, aqui analisados, apresenta cerca de 58% de identidade com a enzima de *T. cruzi*, ao passo que a identidade da enzima de *P. serpens*, sensível a BZ, é de 44%. O conjunto de dados possibilita sugerir que a NTR I não seria responsável pela variação de sensibilidade a BZ nos tripanossomatídeos. Por outro lado, é claro que ensaios *in vitro* deverão comprovar se as NTR I das diferentes espécies são capazes de ativar BZ.

Para a OYE foram reportadas duas cópias gênicas por genoma haploide de *T. cruzi*. Duas cópias de OYE foram encontradas em *C. fasciculata* e *A. deanei* e várias cópias em *S. galati*. OYE é também denominada prostaglandina F2α sintase, uma vez que a enzima reduz a prostaglandina 9,11-endoperóxido PGH2 para PGF2α *in vitro*, além de NFX, BZ e outros fármacos (KUBATA et al. 2002; UCHIYAMA et al. 2005). A atividade de *Tc*OYE no metabolismo de fármacos foi inferida a partir da superexpressão do gene em cepas de *T. cruzi* sensíveis a BZ (ANDRADE et al. 2008) e a partir da verificação da perda do número de cópias gênicas em isolados resistentes a BZ, selecionados *in vitro* (MURTA et al. 2006). Além disto, a imunoprecipitação de *Tc*OYE a partir de lisados de *T. cruzi* aboliu a atividade redutásica para vários compostos, incluindo fármacos nitroheterocíclicos (KUBATA et al. 2002). Dentre as sequências aceitas em nosso estudo, não foram encontradas sequências de OYE em *P. serpens* e em tripanossomas africanos.

O gene e a atividade de prostaglandina F2α sintase foram caracterizados em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo [*L. (L.) donovani* e *L. (L.) tropica*, Genbank AB079545 e AB079546, respectivamente] (KABUTUTU et al. 2002). Os autores reportam que este gene estaria ausente em Leishmanias do Novo Mundo e que a sequência da prostaglandina F2α sintase de *Leishmania* exibe 61% de identidade com a enzima homóloga de *T. brucei* (Genbank AB034727). O alinhamento da proteína de *T. brucei* (Genbank BAB17681.1) com a *Tc*OYE de *T. cruzi* (Genbank XP_821603.10) evidencia não haver

nenhuma similaridade entre ambas, e apoia o fato de não haverem sido encontrados homólogos de OYE nos tripanossomos africanos. Além disto, a superexpressão da prostaglandina F2α sintase de *T. brucei* não promove aumento da resistência a NFX, evidenciando que esta enzima não atuaria na bio-ativação do fármaco (HALL; BOT; WILKINSON, 2011).

Uma vez que foi levantada a hipótese de que OYE atuasse na ativação de BZ e NFX em *T. cruzi* (KUBATA et al. 2002), a ausência de homólogos em *P. serpens* e em tripanossomas africanos, sensíveis a BZ, refutaria essa hipótese.

É interessante comentar que a árvore de OYE não segue o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por outros marcadores moleculares clássicos como gGAPDH e SSU rRNA. Não houve a separação dos dois grandes grupos, os representantes do gênero *Trypanosoma* e os outros tripanossomatídeos não pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. Chama a atenção o padrão de distribuição em ramos distintos das cópias de OYE em *S. galati*. Excluídos possíveis problemas de sequenciamento ou de montagem do genoma deste organismo, isto poderia estar ocorrendo por evolução em concerto.

Para a FeSOD-A foram encontradas sequências em todos os organismos investigados com elevado grau de identidade com a enzima de *T. cruzi*. A árvore desta sequência segue o padrão filogenético de evolução das espécies obtido por outros marcadores moleculares. O possível envolvimento desta enzima na resistência a BZ de *T. cruzi* selecionada *in vitro* por pressão com o fármaco foi sugerido a partir da verificação que o nível de transcritos da FeSOD-A estava aumentado nos parasitos resistentes (NOGUEIRA et al. 2006). Desta forma, no futuro, o nível de transcritos desta enzima poderá ser investigado em espécies sensíveis e resistentes a BZ.

Para o transportador ABCG1, gene de cópia única em *T. cruzi*, foram obtidos homólogos em todos os parasitos analisados. Durante as análises, duas sequências foram aceitas para *L. (L.) infantum, L. (L.) major, C. fasciculata, A. deanei, S. galati* e *P. serpens*, que poderiam ser consideradas parálogas, havendo possivelmente uma evolução em concerto para este gene, uma vez que se agrupam conforme a filogenia das espécies e não a do gene. Pequenas diferenças de aminoácidos são observadas entre as cópias, exceto no caso das cópias de *P. serpens* que apresentam taxas de mutação diferentes. A árvore de ABCG1 segue o padrão filogenético de evolução das espécies conhecido.

Uma diferença marcante na sequência de ABCG1 entre parasitos do gênero *Trypanosoma* e os demais tripanossomatídeos ocorre na região dos 20 primeiros resíduos de

aminoácidos, que contém o sinal PSORT de putativo endereçamento para a mitocôndria. Conforme esperado, há conservação elevada nos motivos Walker A e Walker B e na assinatura ABC. Para o transportador ABCG1 de *T. cruzi*, associado ao fenótipo de resistência natural a BZ, pois promoveria o efluxo do fármaco (ZINGALES et al. 2015), foram observadas trocas de aminoácidos na região de ligação a ATP (NBD) e na região transmembrânica (TMD) entre cepas sensíveis e resistentes a BZ, mas não nas 1ª, 2ª, 4ª e 5ª hélices (FRANCO et al. 2015). No alinhamento da sequência de ABCG1 dos tripanossomatídeos verificam-se muitas trocas de aminoácidos nas várias regiões que uma análise futura mais acurada poderá indicar se são clado-específicas.

Em resumo, na tentativa de obter elementos que pudessem justificar as diferenças de sensibilidade a BZ nos parasitos estudados, foram obtidas as sequências destas proteínas, realizou-se seu alinhamento nos diferentes tripanossomatídeos e foram reconstruídas suas genealogias. Neste estudo, foi evidenciada a ausência de alguns genes em certas espécies, a possível duplicação de alguns genes e quais árvores seguem o padrão filogenético conhecido da evolução dos tripanossomatídeos. Os dados gerados servirão como base para estudos futuros, tanto *in silico*, objetivando a análise mais acurada de regiões de determinados genes, quanto *in vitro*, visando avaliar a atividade dos marcadores, ou mesmo estimulando a investigação dos efeitos da superexpressão ou silenciamento de certos genes na sensibilidade ou resistência a BZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. **ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution.** Bioinformatics, v. 21, n. 9, p. 2104-2105, 2005.

ALLINGER, N. L. **Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms.** Journal of the American Chemical Society, v. 99, n. 25, p. 8127-8134, 1977.

ALTCHEH, J. et al. **Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults.** PLoS Neglected Tropical Disease, v. 8, n. 5, p. e2907, 2014.

ANDRADE, H. M. et al. **Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole.** Journal of proteome research, v. 7, n. 6, p. 2357-2367, 2008.

BAHIA, M. T. et al. **Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease**. PLoS Neglected Tropical Disease, v. 6, n. 11, p. e1870, 2012.

BAKER, J. R.; SELDEN, L. F. ***Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* as a model for chemotherapeutic studies related to Chagas's disease.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 75, n. 1, p. 80-85, 1981.

BERMUDEZ, J. et al. **Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease.** Acta Tropica, v. 156, p. 1-16, 2016.

BOIANI, M. et al. **Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?.** Biochemical pharmacology, v. 79, n. 12, p. 1736-1745, 2010.

BOUTEILLE, B. et al. **Treatment perspectives for human African trypanosomiasis.** Fundamental & Clinical Pharmacology. v. 17, p. 171–181, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Consenso brasileiro em doença de Chagas**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, sup. III, 2005. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/chagas05_consenso_svs.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2017.

BRENER, Z. **Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections.** Advances in Pharmacology, v. 13, p. 1-44, 1975.

BRENER, Z. **Recent advances in the chemotherapy of Chagas Disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 79, p. 149-155, 1984.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. **Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources.** Molecular and biochemical parasitology, v. 149, n. 1, p. 1-9, 2006.

CAMPOS, M. C. et al. **Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert.** Molecular and Biochemical Parasitology, v. 193, p. 17-19, 2014.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease).** Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em: 10 set 2017.

CENCI, U. et al. **Heme pathway evolution in kinetoplastid protists.** BMC Evolutionary Biology, v. 16, n. 1, n. 109, p. 1-18, 2016.

CERECETTO, H. et al. **1, 2, 5-Oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure−activity relationships.** Journal of medicinal chemistry, v. 42, n. 11, p. 1941-1950, 1999.

CERIDÓREO CORRÊA, P. R. et al. ***In vitro* activity of 2-pyridinecarboxylic acid against trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* isolated from the bat *Phyllostomus hastatus***. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 33, n. 4, 2011.

CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. **Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission.** BioMed research international, v. 2014, p. 1-10, 2014.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHATELAIN, E. **Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era.** Journal of Biomolecular Screening, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHEMAXON. **Marvin Beans versão 5.0.4.** ChemAxon Ldt.: Budapeste, Hungria, 1998-2010. Disponível em: <http://www.chemaxon.com>. Acesso em: 25 fev. 2016.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. **Randomized Controlled Clinical Trial to Access Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 84, n. 2, p. 255–260, 2011.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. **Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases.** The Lancet, v. 375, n. 9710, p. 239-247, 2010.

COURA, J. R; VIÑAS, P A. **Chagas disease: a new worldwide challenge.** Nature, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 2010.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.** TRENDS in Parasitology, v. 19, n.11, nov. 2003.
DAVOLL, J. et al. **Folate Antagonists. 2. 2,4-Diamino-6-([aralkyl and (heterocyclic)methyl)amino)quinazolines, a Novel Class of Antimetabolites of Interest in Drug-Resistant Malaria and Chagas' Disease?** Journal of Medicinal Chemistry, v. 15, n. 8, 1972.

DA SILVA, R. V. et al. **Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi.*** PloS one, v. 8, n. 7, p. e68299, 2013.

DE ORNELAS TOLEDO, M. J. et al. **Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 47, n. 1, p. 223-230, 2003.

DESQUESNES, M. et al. **Zoonotic trypanosomes in South East Asia: Attempts to control *Trypanosoma lewisi* using human and animal trypanocidal drugs.** Infection, Genetics and Evolution, v. 44, p. 514-521, 2016.

DEWAR, M. J .S. et al. **Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model.** Journal of the American Chemical Society, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DIAS, L. C. et al. **Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos.** Química Nova, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DÍAZ DE TORANZO, E. G. et al. **Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*.** Experientia, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DND*i* (Drugs for Neglected Diseases initiative). **Estratégia da DNDi.** Disponível em: <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas/estrategia-da-dndi.html>. Acesso em: 10 fev. 2017a.

DND*i* (Drugs for Neglected Diseases initiative). **Paediatric dosage form of Benznidazole (Chagas).** Disponível em: <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/paediatric-benznidazole/>. Acesso em: 10 fev. 2017b.

DND*i* (Drugs for Neglected Diseases initiative). **Chagas Clinical Research Platform.** Disponível em: <http://www.dndi.org/strengthening-capacity/chagas-platform/>. Acesso em: 10 fev. 2017c.

DORLO, T. P. C. et al. **Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, nov. 2012.

DUFERNEZ, F. et al. **The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, subcellular localization, and**

phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei.* Free Radical Biology and Medicine, v. 40, n. 2, p. 210-225, jan. 2006.

EL-SAYED, N. M. et al. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi,* etiologic agent of Chagas disease.** Science, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

ESCOBAR, P. et al. **Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH 3 (edelfosine) and amphotericin B.** Acta tropica, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. **Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. **Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.

FLEGONTOV, P. et al. ***Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid.** Current Biology, v. 23, n. 18, p. 1787-1793, 2013.

FRANCO, J. et al. **ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benznidazole resistance: Gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates.** Infection, Genetics and Evolution, v. 31, p. 198-208, 2015.

GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. **SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny.** Computer Applications in the Biosciences, v. 12, p. 543-548, 1996.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. **Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: an analysis of ALOGP and CLOGP methods.** The Journal of Physical Chemistry A, 1998, v. 102, n. 21, p. 3762–3772, 1998.

GUAN, J. et al. **Antimalarial Activities of New Pyrrolo[3,2-f]Quinazoline-1,3-Diamine Derivatives.** Antimicrobial Agents and Chemoterapy, v. 49, n. 12, p. 4928-4933, 2005.

GUTTERIDGE, W. E. et al. ***Crithidia fasciculata*: a catalase-containing trypanosomatid sensitive to nitroheterocyclic drugs.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 76, n. 4, p. 493-496, 1982.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. **Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites.** Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. **Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal formation**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, n. 1, p. 115-123, 2012.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. **Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 44, n. 1, p. 15-25, jul. 2007.

HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G.; STEVENS, J. R. **The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis.** Trends in Parasitology, v. 28, n. 4, abr. 2012.

HYPERCUBE. **Hyperchem versão 8.0.** Hypercube Inc.: Gainesville, FL, EUA, 1985-2007. Disponível em: <http:// www.hyper.com>. Acesso em: 25 fev. 2016.

ISHII, M. et al. **Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole as potential antibacterial, anti-*Trypanosoma cruzi* and antifungal agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 19, n. 21, p. 6292-6301, nov. 2011.

JACKSON, A. P. **Genome evolution in trypanosomatid parasites.** Parasitology, v. 142, p. 40-56, 2015.

JASKOWSKA, E. et al. ***Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments.** PLoS Pathogens, v. 11, n. 1, p. e1004484, 2015.

JHA, T. K. et al. **Miltefosine, an Oral Agent, for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis.** N Engl J Med, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, dez. 1999.

JONES, A. J.; AVERY, V. M. **Future treatment options for human African trypanosomiasis.** Expert Review of Anti-infective Therapy, v. 13, n. 12, p.1429–1432, 2015.

KABUTUTU, Z. et al. **Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9, 11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*.** International journal for parasitology, v. 32, n. 14, p. 1693-1700, 2002.

KEATING, J. et al**. Human African trypanosomiasis prevention, treatment and control costs: a systematic review.** Acta tropica, v. 150, p. 4-13, 2015.

KIRUTHIGA, B. et al. **Synthesis of some new 2-substituted Quinazolin-4-one Derivatives and their Biological Activities.** International Journal of PharmTech Research, v. 1, n. 4, p. 1503-1506, out./dez. 2009.

KLOPMAN, G. et al. **Computer automated log P calculations based on an extended group contribution approach.** Journal of Chemical Information and Computer Sciences, v. 34, n. 4, p. 752-781, 1994.

KUBATA, B. K. et al. **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.

LEEKUMJORN, S.; SUM, A. K. **Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1758, n. 11, p. 1751–1758, 2006.

LIMA, L. et al. **Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species.** Protist, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2012.

LIMA, L. et al. **Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit).** Acta Tropica, v. 151, p. 166-177, nov. 2015

LIPINSKI, C. A. et al. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** Advanced drug delivery reviews, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

MACHADO, P. R. et al. **Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensi* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 12, p. 1-6, dez. 2010.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. **Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MARCILI, A. et al. **A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA.** Parasitology, v. 136, n. 6, p. 641-655, mai. 2009.

MARCHLER-BAUER, A. et al. **CDD: NCBI's conserved domain database.** Nucleic Acids Research, v. 43, n. D1, p. D222-D226, 2014.

MARINKELLE, C. J. **The effect of Lampit on *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice**. Tropenmedizin und Parasitologie, v. 33, n. 3, p. 151-152, 1982.

MARSDEN, P. D. et al. **Nifurtimox in the treatment of South American leishmaniasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 73, n. 4, p. 391-394, 1979.

MARTINS-MELO, F. R. et al. **Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas.** Tropical Medicine & International Health, v. 17, n. 9, p. 1066-1075, 2012.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. **Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a Staphylococcus aureus multi-resistente (MRSA).** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 203-214, 2006.

MAYA, J. D. et al. **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988).** Free Radical Biology and Medicine, v. 5, n. 5-6, p. 363-369, 1988.

MEJIA, A. M. et al. **Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population.** Journal of Infectious Diseases, p. jis331, 2012.

MENDOZA-MARTÍNEZ, C. et al. **Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypanosomatid and anti-plasmodial agents.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 96, p. 296-307, 2015.

MERCALDI, G. F. et al. **Discovery of New Uncompetitive Inhibitors of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase.** Journal of Biomolecular Screening, v. 19, n. 10, p. 1372-1371, 2014.

MESSENGER, L. A.; MILES, M. A. **Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*.** Acta tropica, v. 151, p. 150-155, 2015.

MOLINA, I. et al. **Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease.** The New England Journal of Medicine, v. 370, n. 20, p. 1899-1908, mar. 2014.

MORAES, C. B. et al. **Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development.** Scientific reports, v. 4, n. 4703, p. 1-11, 2014.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. **An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 54, p. 1861–1875, 2004.

MORENO, S. N. J. et al. **Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and Trypanosoma cruzi microsomal preparations.** Archives of biochemistry and biophysics, v. 218, n. 2, p. 585-591, 1982.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of immunological methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURCIA, L. et al. **Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermidad de Chagas.** Enfermidades Infecciosas y Microbiologia Clínica, n. 31, p. 26-34, 2013.

MURTA, S. M. et al. **Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox.** Molecular and Biochemical Parasitology, v. 93, n. 2; p. 203-214, 1998.

MURTA, S. M. F. et al. **Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced**

benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. Molecular Biochemical Parasitology, v. 146, n. 2, p. 151–162, 2006.

NAWATHEAN, P; MASLOV, D. A. **The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*.** Current genetics, v. 38, n. 2, p. 95-103, 2000.

NEAL, R. A.; CROFT, S. L. **An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 14, p. 463-475, 1984.

NOGUEIRA, F. B. et al. **Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (*Tc*FeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole.** Acta tropica, v. 100, n. 1, p. 119-132, 2006.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Neglected tropical diseases.** Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 10 fev. 2017a.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: < http://www.who.int/chagas/en/>. Acesso em: 10 fev. 2017b.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **WHO Expert Committee on Biological Standardization**. WHO Technical Report Series, Geneva, n. 980, 2012.

OPAS (Organização Pan Americana de Saúde). **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos.** Série de Manuais Técnicos, Rio de Janeiro, n. 12, 2009.

PALACE-BERL, F. et al. **5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-Trypanosoma cruzi agents: Design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 21, p. 5395-5406, 2013.

PALACE-BERL, F. et al. **Designing and exploring active N0 -[(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 96, p. 330-339, 2015.

PALACE-BERL, F. et al. **Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against *Trypanosoma cruzi* to design novel active compounds.** European journal of medicinal chemistry, v. 144, p. 29-40, 2018.

PALACE-BERL, F. **Planejamento de fármacos anti-*T. cruzi*: Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade biológica *in vitro* e estudos de relações estrutura-atividade.** 2016. 375p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. **Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects.** Trends in Parasitology, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.

PAVIA, P. X. et al. **Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the Histone H2A/SIRE and the SNO-RNA-CL1 genes.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 49, n. 1, p. 23-30, 2007.

PEÑA, I. et al. **New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: Na Open Resource.** Scientific Reports, v. 45, 2015.

PÉPIN, J. et al**. High-dose nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: an open trial in central Zaire.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 86, p. 254–256, 1992.

POLAK, A.; RICHLE, R. **Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology. v. 72, n. 1, p.45-54, 1978.

POLAK, E.; RIBIÈRE, G. **Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées.** Revue française d'informatique et de recherche opérationnelle. Série rouge, v. 3, n. 16, p. 35-43, 1969.

PORCEL, B. M. et al. **The streamlined genome of *Phytomonas s*pp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants.** PLoS genetics, v. 10, n. 2, p. e1004007, 2014.

PRATHALINGHAM, R. S. et al. **Deletion of the *Trypanosoma brucei* Superoxide Dismutase Gene sodb1 Increases Sensitivity to Nifurtimox and Benznidazole**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, p. 755-758, 2007.

PRIOTTO, G. et al. **Nifurtimox–eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, noninferiority trial.** The Lancet. v. 374, p. 56–64, 2009.

RAAFLAUB J. **Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. Arzneimittelforschung.** v. 30, p. 2192–2194, 1980.

RAMOS JR, A. N.; CARVALHO, D. M. **Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas.** Cadernos de Saúde Pública, v. 17, n. 6, p. 1403-1412, 2001.

RASSI, Jr. A. et al. **Chagas Disease.** Lancet, v. 375, p. 1388-1402, abr. 2010.

REGUEIRA, J. L. L.; DE FREITAS, J. J. R; FREITAS FILHO, J. R. **Preparation of 1, 2, 4-Oxadiazoles: teaching-learning sequence applied to the course on organic synthesis in undergraduate studies.** Química Nova, v. 39, n. 8, p. 1019-1025, 2016.

REIS, S. R. et al. **Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas.** Acta Amazônica, v. 43, n. 1, p. 121–124, 2013.

ROJAS-AGUIRRE, Y. et al. **Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1818, p. 738-746, 2012.

SAHU, V. H. R. **Review article on 1, 3, 4-Oxadiazole derivaties and it's Pharmacological activities.** International Journal of ChemTech Research, v. 3, n. 3, p. 1362-1372, jul./set. 2011.

SANTOS FILHO, J. M. et al. **Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-*N*-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 17, p. 6682-6691, 2009.

SANTOS FILHO, J. M. et al. **Optimization of anti-*Trypanosoma cruzi* oxadiazoles leads to identification of compounds with efficacy in infected mice.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 20, n. 21, p. 6423-6433, nov. 2012.

SIEVERS, F. et al. **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.** Molecular systems biology, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al**. Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a "luta antivetorial" em questão Chagas's disease and deep ecology: the anti-vectorial fight in question.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 2, p. 677-687, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis.** 5 ed. Editora Saunders College Publishing, 1998.

SOKOLOVA, A. Y. et al. **Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 54, n. 7, p. 2893-2900, 2010.

SOTO, J. et al. **Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis.** Clinical Infectious Diseases, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, mai. 2004.

SOUZA, W. **A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 94, n. 1, p.17-36, 1999.

STAMATAKIS, A. **RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies.** Bioinformatics, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

STEVENS, J. R. et al. **The Molecular Evolution of Trypanosomatidae.** Advances in Parasitology, v. 48, p. 1-53, 2001.

STEVENS, J. R. **Kinetoplastid Phylogenetics, with Special Reference to the Evolution of Parasitic Trypanosomes.** Parasite, v. 15, n. 3, p. 226-232, set. 2008.

STOPPANI, A. O. M. **Bioquímica del *Trypanosoma cruzi*.** Interciencia: revista de ciencia y tecnología para el desarrollo, v. 8, n. 6, p. 396-404, 1983.

SUNDAR, S. et al. **Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis.** The New England Journal of Medicine, v. 347, n. 22, nov. 2002.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods).** Sunderland, MA. 2002.

TEIXEIRA, M. M. G. et al. **Phylogenetic Validation of the Genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids Harboring Bacterial Endosymbionts with the Description of New Species of Trypanosomatids and of Proteobacterial Symbionts.** Protist, v. 162, n. 3, p. 503-524, 2011.

TEMPERTON, N. J. et al. **Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole.** Molecular and biochemical parasitology, v. 96, n. 1, p. 167-176, 1998.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. **The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on.** Trends in parasitology, v. 18, n. 9, p. 405-410, 2002.

TIBAYRENC, M. et al. **Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 83, n. 1, p. 115-119, 1986.

TIBAYRENC, M. **Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach.** International journal for parasitology, v. 28, n. 1, p. 85-104, 1998.

TROCHINE, A. et al. **Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 8, n. 5, e2844, 2014.

TSUHAKO, M. H. et al. **Comparative studies of nifurtimox uptake and metabolism by drug-resistant and susceptible strains of *Trypanosoma cruzi*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, v. 99, n. 3, p. 317-321, 1991.

UCHIYAMA, N. et al. **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.

ULIANA, S. R. et al. **Chemotherapy of Leishmaniasis: Present Challenges.** Parasitology, p. 1-17, 2017.

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

VIJAYCHAND, A. et al. **Medicinal and Biological Significance of Quinazoline: A Highly Important Scaffold for Drug Discovery: A Review**. International Journal of Pharma and Bio Sciences, v. 2, jan./mar. 2011.

VISWANADHAN, V. N. et al. **Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics.** Journal of chemical information and computer sciences, v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

VOAK, A. A. et al. **An Essential Type I Nitroreductase from *Leishmania major* Can Be Used to Activate Leishmanicidal Prodrugs**. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 40, p. 28466-28476, 2013.

WANG, D. et al. **Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities.** Chemistry Central Journal, v. 7, n. 95, p. 1-15, 2013.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. **Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen.** Biochemische Zeitschrift, v. 266, p. 377-411, 1933.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. **Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets**. Expert reviews in molecular medicine. v. 11, e31, 2009**.**

WILKINSON, S. R. et al. **A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

WYLLIE, S. et al. **Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in *Leishmania*.** PLoS pathogens, v. 12, n. 11, p. e1005971, 2016.

WYLLIE, S.; PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A. H. **Assessing the essentiality of *Leishmania donovani* nitroreductase and its role in nitro drug activation.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 57, n. 2, p. 901-906, 2013.

YOSHIDA, N. et al. ***Trypanosoma cruzi*: Parasite and Host Cell Signaling during the Invasion Process.** In: Molecular Mechanisms of Parasite Invasion. Subcellular Biochemistry, v. 47, p. 82-91, 2008.

YUN, O. et al. **Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolívia: 10-year experience of Medecins Sans Frontieres**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 3, n. 7, p. 1-8, 2009.

ZHOU, Y. et al. **Thinking outside the "bug": a unique assay to measure intracellular drug penetration in gram-negative bacteria.** Analytical chemistry, v. 87, n. 7, p. 3579-3584, 2015.

ZINGALES, B. et al. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**. Rio de Janeiro: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, nov. 2009.

ZINGALES, B. et al. **A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 110, n. 2, p. 433–444, 2015.

ZINGALES, B. et al. **Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, p. 159-164, 1999.

ZINGALES, B. et al. **Revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** Infection, Genetics and Evolution, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. ***Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.** Acta Tropica, set. 2017.

APÊNDICE A - Composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi.*

Tabela A.1: Composição dos meios LIT-He e LIT-Hb.

Componentes	LIT-He	LIT-Hb
Triptose	20 g	5 g
NaCl	16 g	4 g
Na_2HPO_4	32 g	15 g
KCl	1,60 g	0,40 g
Penicilina	0,18 g	0,15 g
Estreptomicina	0,18 g	0,15 g
Glicose	10 g	2 g
Infusão de Fígado	5 g	5 g
Hemoglobina fetal	-	6% - 8%
Hemina	0,025 g	-
Água Milli-Q (completar)	1 L	1 L
pH	7,4	7,4

APÊNDICE B - Composição do meio LIT-Es.

Tabela B.1: Composição do meio LIT-Es.

Componentes	LIT-Es
Triptose	5 g
NaCl	4 g
Na_2HPO_4	8 g
KCl	0,4 g
NaOH 0,1 N	1 mL
Penicilina	50 mg
Estreptomicina	50 mg
Glicose	2 g
Infusão de Fígado	5 g
Hemoglobina fetal	-
Hemina	10 mg
Água Milli-Q (completar)	1 L
pH	7,4

APÊNDICE C - Curvas de absorbância de formazan pela concentração de parasitos.

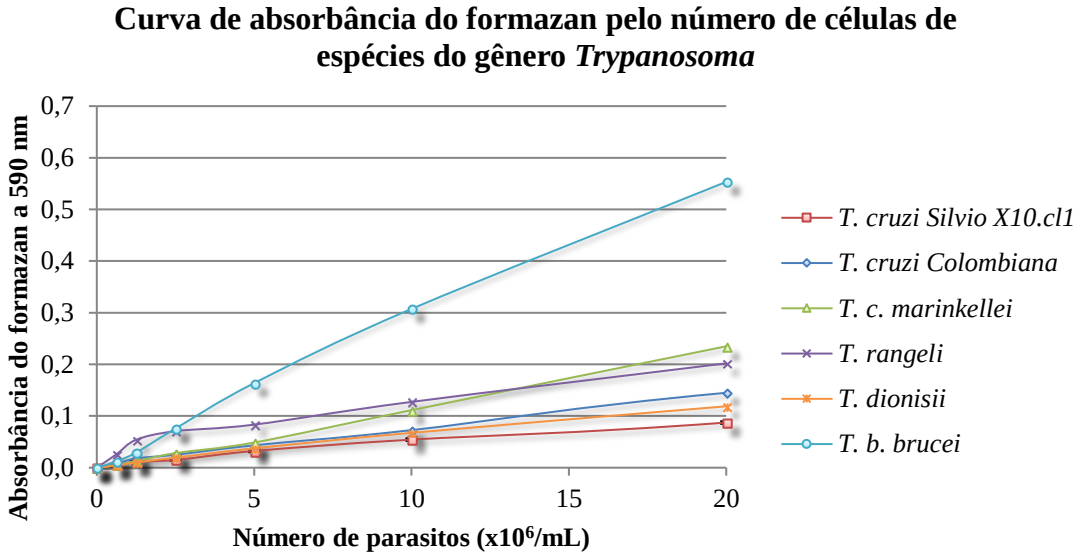


Figura C.1: Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de espécies representantes do gênero *Trypanosoma*.

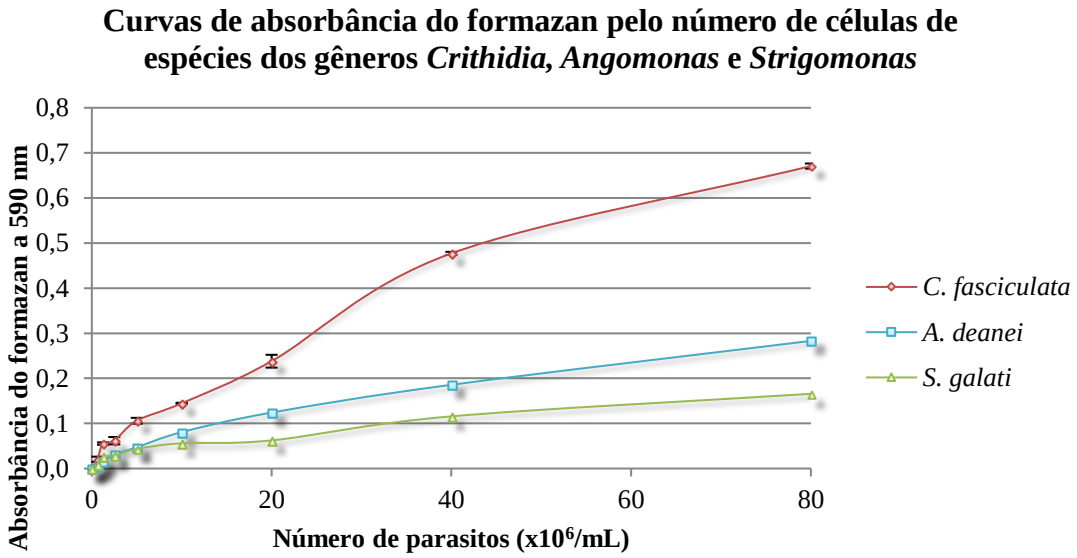


Figura C.2: Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de espécies representantes dos gêneros *Crithidia*, *Angomonas* e *Strigomonas*.

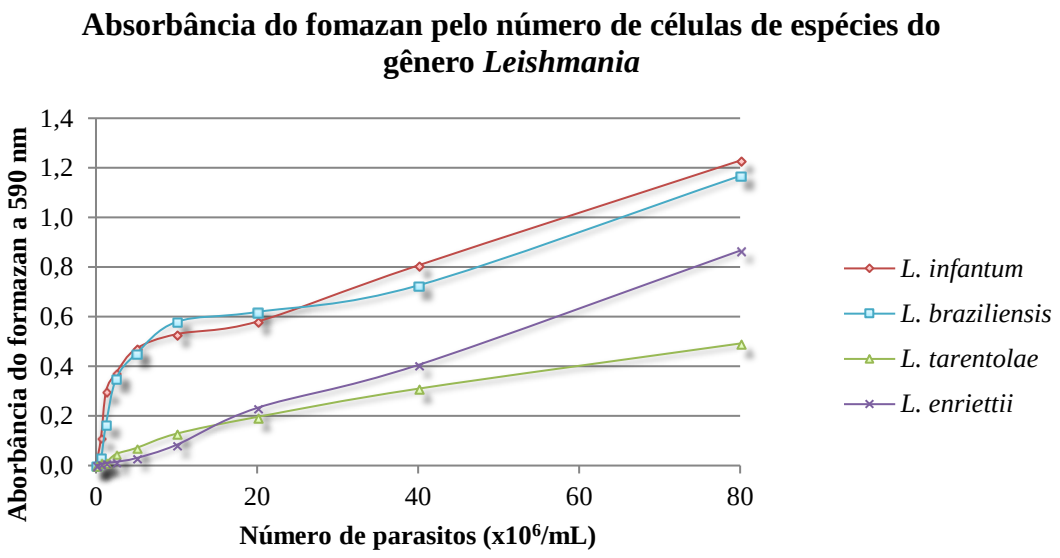


Figura C.3: Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de espécies representantes do gênero *Leishmania*.

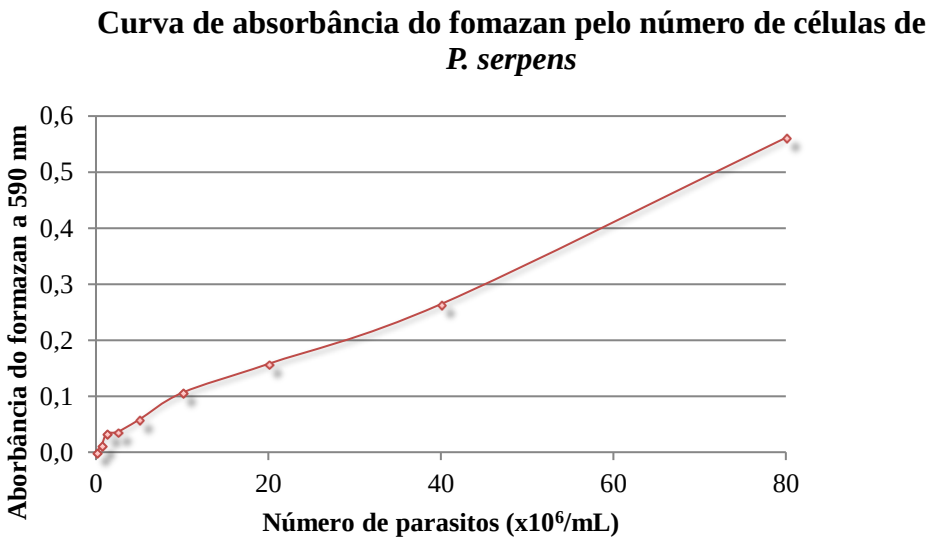


Figura C.4: Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de *Phytomonas serpens*.

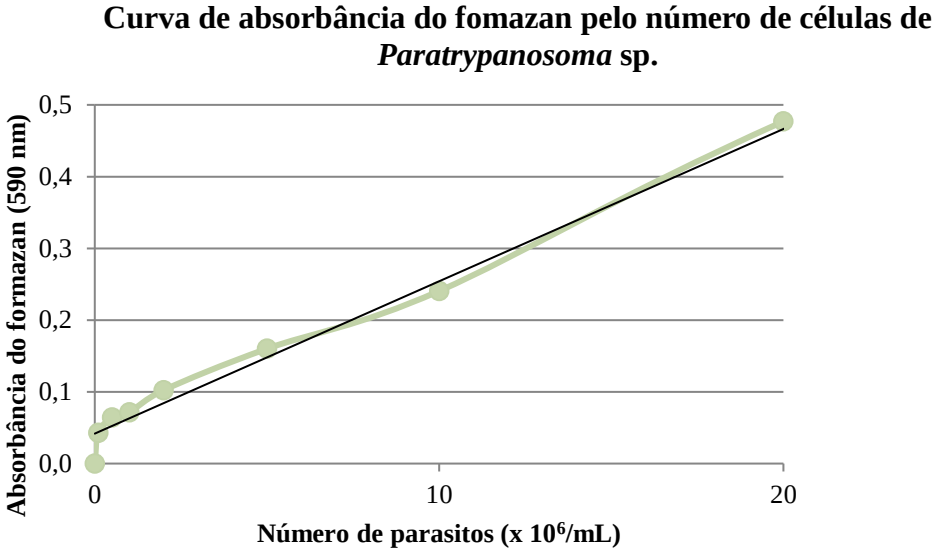


Figura C.5: Curva da absorbância do formazan a 590 nm pela concentração de *Paratrypanosoma* sp.