

**Instituto Oswaldo Cruz**

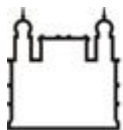
**Doutorado em Biologia Parasitária**

**Estudo do mecanismo de resistência a compostos derivados da classe das  
tiossemicarbazonas em tripanosomatídeos, com ênfase na glicoproteína-P e  
na nitrorredutase do tipo I**

**Mônica Caroline Oliveira Campos**

**Rio de Janeiro**

**2014**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Mônica Caroline Oliveira Campos

**Estudo do mecanismo de resistência a compostos derivados da classe das tiossemicarbazonas em tripanosomatídeos, com ênfase na glicoproteína-P e na nitrorredutase do tipo I**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biologia Parasitária

Orientadora: Dra. Leonor Laura Leon

Rio de Janeiro, 9 de junho de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

C198 Campos, Mônica Caroline Oliveira

Estudo do mecanismo de resistência a compostos derivados da classe das tiossemicarbazonas em tripanosomatídeos, com ênfase na glicoproteína-P e na nitrorredutase do tipo I/ Mônica Caroline Oliveira Campos – Rio de Janeiro, 2014.

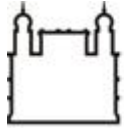
xiii, 120 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 94-120.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Leishmania (L.) amazonensis*. 3. Tiossemicarbazonas. 4. Benznidazol. 5. Glicoproteína-P. 6. Nitrorredutase. Título.

CDD: 616.96



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Autora: Mônica Caroline Oliveira Campos

**Estudo do mecanismo de resistência a compostos derivados da classe das tiossemicarbazonas em tripanosomatídeos, com ênfase na glicoproteína-P e na nitrorredutase do tipo I**

Orientadora: Dra. Leonor Laura Leon

Aprovada em: 09/06/2014

Examinadores:

Profa. Dra. Solange De Castro – Presidente da Banca e Revisora- IOC

Prof. Dra. Técia Maria Ulisses de Carvalho - UFRJ

Prof. Dr. Adeilton Alves Brandão-IOC

Suplentes

Prof Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva -UERJ

Prof Dra. Marilene Marcuzzo Canto-Cavalheiro- IOC

Rio de Janeiro, 9 de junho de 2014.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), sob orientação da Dra. Leonor L. Leon. Parte do trabalho experimental, incorporada nos capítulos 2, 4 e 5, foi realizada no Departamento de Biologia Molecular de Patógenos em colaboração com os Drs. John M. Kelly e Martin C. Taylor, na London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), Londres, Reino Unido, com base no Programa de Doutorado Sanduíche, Ciência Sem Fronteiras.

Esta tese é composta por 2 artigos, 1 manuscrito a ser submetido, e pelo capítulo 4 e anexo 1 que tratam dos temas Glioxalase e Luciferase, respectivamente.

"Que me dêem uma boa razão para que os jovens se apaixonem pela Ciência. Sem isto, a parafernália educacional permanecerá flácida e impotente. Porque sem uma grande paixão não existe conhecimento."

**Rubem Alves**

**Dedico esta tese aos meus pais Márcio e Elizabeth, por todo amor, suporte, paciência e compreensão.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Márcio e Elizabeth, e irmãos Maria, Márcia e Marco Antônio por todo carinho e suporte ao longo destes anos. Amo vocês!

À Dra. Leonor Leon, excelente profissional e orientadora, pela confiança em mim depositada e pela competência com a qual me conduziu até aqui. Obrigada por todos os ensinamentos e por ser um exemplo de motivação! Tenho muito orgulho de ter feito parte da sua história científica!

Ao Dr John Kelly, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, dando-me apoio e transmitindo-me grandes conhecimentos. Obrigada pela gentileza e entusiasmo com que me orientou durante o doutorado sanduíche. Experiência inesquecível!

À Dra. Denise Castro-Pinto pelo apoio em todos os momentos desde o início da tese, pelas nossas discussões científicas, pelo entusiasmo e disposição em solucionar os desafios da tese, pela amizade e compreensão, muito obrigada.

À Dra. Marilene Marcuzzo do Canto-Cavalheiro, pelo apoio e incentivo sempre. Nossas discussões sobre química e cultura foram muito enriquecedoras para mim.

À Dra Márcia Berredo-Pinho, pelos ensinamentos, energia e determinação contagiante. Sua contribuição foi sem dúvida, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores Áurea Echevarria, Leonardo Gomes, Grazielle Ribeiro, Myrtes Bellieny, Carla Goulart, Christian Reis e Taane Clark que gentilmente contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigada!

Aos amigos Martin Taylor, Amanda Francisco, Alex McLatchie, Michael Lewis e Laura Mueller, não apenas pelos ensinamentos científicos, como também, pelos momentos tão divertidos no laboratório.

Aos "amigos do pub" David, Christian, Tapan, Ellie, Laura, Nuno, Bekah, Jiali, Paul, Beak, Lou, Chevonne, Harvey e Gisela pela "London Pride", companheirismo e momentos impagáveis que passamos juntos.

Ao querido amigo Ozan Gundogdu pelo carinho, apoio e amizade, teşekkür ederim!

Aos queridos amigos Liliane, Raquel, Karen, Marcos e Dawn pelo carinho, amizade, apoio em diversos momentos, contem comigo sempre!

A todos os amigos do LBqT, principalmente Renata, Gérzia, Mariela, Caio, Elmo, Valter, Edezio, Solange, Viviane, Luiza, Job, Fernanda, Rosa, Karine, Klaus e Ludmila pelos momentos científicos e descontraídos que passamos ao longo desses anos.

À coordenação de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, pelo suporte dado ao desenvolvimento da minha tese e à CAPES pelo apoio financeiro.



## ABREVIATURAS

|          |   |
|----------|---|
| Pgp      | Glicoproteína-P                                       |
| 2-MEOTIO | 4-N-(2'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona             |
| 3-MEOTIO | 4-N-(4'-hidroxi-3'-metoxi estiril)- tiossemicarbazona |
| BZ       | Benznidazol   |
| MDR      | <i>Multidrug resistance</i>                           |
| ABC      | <i>ATP-binding cassette</i>                           |
| LIT      | <i>Liver infusion tryptose</i>                        |
| PBS      | tampão salina fosfato                                 |
| M15      | <i>T. cruzi</i> resistente ao 2- MEOTIO               |
| B15      | <i>T. cruzi</i> resistente ao BZ                      |
| LA10     | <i>L. amazonensis</i> resistente ao 3-MEOTIO          |
| NTR      | Nitrorredutase  |
| VP       | Verapamil   |
| CsA      | Ciclosporina A  |
| SOV      | <i>Sodium orthovanadate</i>                           |
| SBF      | Soro fetal bovino                                     |
| LTA      | Leishmaniose tegumentar americana                     |
| LVA      | Leishmaniose visceral americana                       |
| µg       | Micrograma  |
| µM       | Micromolar  |
| g        | Grama   |
| µL       | microlitro  |

## Índice

|   |      |
|---|------|
| Dedicatória   | vii  |
| Agradecimentos  | viii |
| Abreviaturas  | ix   |
| Resumo  | xii  |
| Abstract  | xiii |
| 1. Introdução   | 01   |
| 1.1. Doença de Chagas   | 02   |
| 1.1.1. Agente etiológico e ciclo evolutivo  | 03   |
| 1.1.2. Considerações gerais sobre a doença de Chagas  | 06   |
| 1.2. Leishmaniose   | 10   |
| 1.2.1. Agente etiológico e ciclo evolutivo  | 12   |
| 1.2.2. Considerações gerais sobre a leishmaniose  | 13   |
| 1.3. Tiosemicarbazonas  | 14   |
| 1.4. Mecanismo de resistência a drogas  | 18   |
| 1.4.1. Glicoproteína-P  | 19   |
| 1.4.2. Nitrorredutases  | 22   |
| 2. Objetivos  | 25   |
| 3. Capítulo 1 - Campos et al. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in <i>Trypanosoma cruzi</i> drug resistance, Parasitol Res, 2013,112(6): 2341-51                   | 27   |
| 4. Capítulo 2 - Campos et al. Immunolocalization of P-glycoprotein in drug resistant trypanosomatids. A ser submetido para publicação.  | 41   |
| 5. Capítulo 3 - Campos et al. Benznidazole-resistance in <i>Trypanosoma cruzi</i> : Evidence that distinct mechanisms can act in concert, Mol Biochem Parasitol, 2014, 193(1):17-9. | 53   |

|  |    |
|--|----|
| 6. Capítulo 4 - Análise do papel da enzima glioxalase I no mecanismo de resistência ao Benznidazol em <i>Trypanosoma cruzi</i> | 57 |
| 7. Anexo 1 - Validação <i>in vitro</i> de cepas de <i>T. cruzi</i> transgênicas expressando o gene red-shifted-luciferase      | 66 |
| 8. Discussão   | 79 |
| 9. Conclusões  | 91 |
| 10. Referências bibliográficas   | 94 |

## RESUMO

Os tratamentos disponíveis para a doença de Chagas e as leishmanioses não são eficientes e apresentam alta toxicidade. Diversos estudos mostram que há possibilidade de indução de resistência de *Trypanosoma cruzi* ao Benznidazol (BZ) o que pode interferir na eficácia do tratamento. O mesmo tem sido relatado com relação aos fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses, embora não exista um mecanismo de ação definido para a resistência a drogas nestes protozoários. Neste trabalho foram focalizados dois potenciais mecanismos: 1) atividade da glicoproteína-P (Pgp), uma proteína de membrana que atua como uma bomba de efluxo dependente de energia e associada ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR); 2) a enzima nitrorredutase presente em *T. cruzi* (TcNTR), reponsável pela redução de nitroderivados, como BZ, para obter o efeito tripanocida. Na busca de novos compostos seletivos contra *T. cruzi* e *Leishmania amazonensis*, nosso grupo vem estudando derivados da classe das tiossemicarbazonas. Em estudos prévios foi observado que o derivado 4-N-(2-metoxi-estiril)-tiossemicarbazona (2-MEOTIO) foi o composto mais efetivo sobre diferentes formas de *T. cruzi*, enquanto 4-N-(4'-hidroxi-3'-metoxi-estiril)-tiossemicarbazona (3-MEOTIO) se mostrou o mais eficiente contra *L. amazonensis*. O mecanismo de resistência a estes compostos foi avaliado, e nossos resultados mostram a participação da Pgp na resistência a 2-MEOTIO e BZ em *T. cruzi*, e a 3-MEOTIO em *L. amazonensis*. Ainda, em *T. cruzi* a participação da Pgp parece estar associada não somente à membrana plasmática, como também à mitocôndria. Em *T. cruzi*, a perda da função do gene da TcNTR está relacionada à resistência ao BZ, no entanto, foi possível demonstrar que outros mecanismos de resistência estão atuando em conjunto nestes parasitos, e ainda, que os mecanismos são diferentes entre clones isolados de uma mesma população (B15). Também descrevemos nesta tese, a validação *in vitro* da expressão da luciferase em diferentes cepas de *T. cruzi* transfectadas com o gene *red-shifted-luciferase*, a serem utilizadas em futuros ensaios de imagem por bioluminescência *in vivo*. Os mecanismos de resistência a drogas em *T. cruzi* e *L. amazonensis* apresentados neste trabalho podem contribuir para a identificação de novos alvos nestes tripanosomatídeos, objetivando o desenho racional de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas e leishmanioses.

## ABSTRACT

The available drugs for the treatment of Chagas disease and leishmaniasis are not efficient and cause toxic side effects. Several studies show the possibility of drug resistance induction to Benznidazol (BZ) in *Trypanosoma cruzi*, which may interfere with the treatment efficacy. The same has been observed regarding compounds used to treat leishmaniasis, although more studies on drug resistance mechanism are needed. In the present study we focused on two potential drug resistance mechanisms: 1) P-glycoprotein (Pgp) activity, a membrane protein which acts as an efflux pump energy-dependent and is associated with the multidrug resistance phenotype (MDR); 2) the enzyme nitroreductase (TcNTR) found in *T. cruzi*, which is responsible for the reduction of nitroheterocyclic derivatives, such as Bz and Nifurtimox, generating metabolites with trypanocidal activity. In the search for new selective drugs for the treatment of Chagas disease and leishmaniasis, our group has been studying compounds from the class of the thiosemicarbazones. Previous studies showed that the 4-N-(2-methoxy-styryl)-thiosemicarbazone (2-MEOTIO) was the most efficient compound on different forms of *T. cruzi*, whereas 4-N-(4'-hidroxy-3'-methoxy styryl)-thiosemicarbazone (3-MEOTIO) was the most active on *Leishmania amazonensis*. Here we evaluated the drug resistance mechanism to both thiosemicarbazone derivatives, as well as, to BZ which was used as reference drug for *T. cruzi*. Our results show the participation of Pgp in the resistance to both 2-MEOTIO and BZ in *T. cruzi*, as well as in the resistance in *L. amazonensis* to the compound 3-MEOTIO. Interestingly, in *T. cruzi* the participation of Pgp is related to its localization not only in the plasma membrane but also in the mitochondrion. In addition, in *T. cruzi*, the loss of the TcNTR gene function is involved in BZ-resistance, however it was also shown that other mechanisms of drug resistance are also involved and that that these mechanisms may be different even among clones obtained from a single population (B15). We also described here the *in vitro* validation of the expression of luciferase in different *T. cruzi* strains transfected with the *red-shifted*-luciferase gene, which will be further used in bioluminescence imaging assays *in vivo*. The drug resistance mechanisms in *T. cruzi* and *L. amazonensis* shown here may be useful in the identification of parasite targets, aiming the rational design of new drugs to treat for Chagas disease and leishmaniasis.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

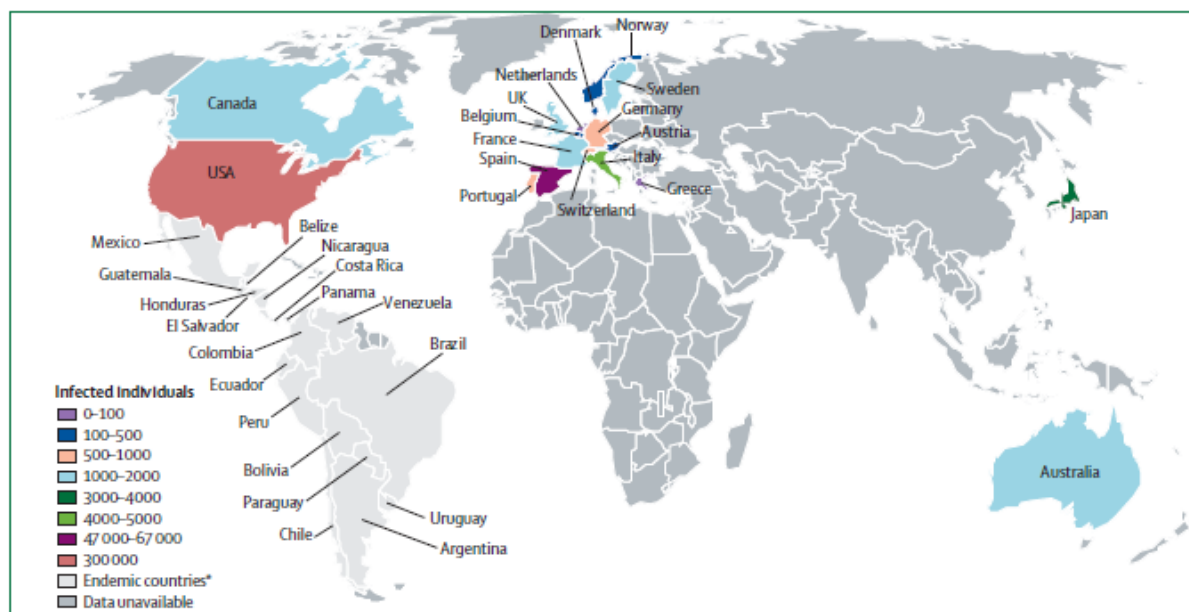
A doença de Chagas (tripanosomíase americana) e as leishmanioses são doenças tropicais causadas por protozoários parasitos. Atingem principalmente as classes menos favorecidas da sociedade, e por isso, o investimento em políticas de controle da transmissão não é uma prioridade das autoridades nas regiões endêmicas. Portanto, essas parasitoses estão incluídas dentro da classificação de doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

### **1.1. Doença de chagas**

A descoberta da doença de Chagas em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas foi um dos mais importantes acontecimentos na história da biologia parasitária no Brasil. Pela primeira vez, um único pesquisador descreveu um novo parasito, seu vetor, seu ciclo silvestre e domiciliar, animais suscetíveis à infecção, sintomatologia, formas clínicas, mecanismos de transmissão, epidemiologia e profilaxia (Chagas, 1909a,b, 1910, 1916a,b). No entanto, os humanos já eram acometidos pela doença de Chagas há pelo menos 9.000 anos, segundo estudo de paleoparasitologia realizado em múmias encontradas no deserto do Atacama, no Chile (Aufderheide e cols., 2004).

A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina e é a doença parasitária responsável por mais mortes na região. A estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013) é de que 8 milhões de pessoas estejam infectadas e 100 milhões estejam sob risco de infecção. Devido à migração de pessoas a partir das regiões endêmicas, casos da doença têm sido registrados em países como Estados Unidos, Austrália, e Espanha. Embora alguns casos de transmissão vetorial autóctone tenham sido registrados nos EUA (Bern e cols., 2011), as principais formas de transmissão da doença de Chagas nas áreas não-endêmicas são a transfusão sanguínea, doação de órgãos e transmissão congênita. Nestes países, a falta de conhecimento por parte dos profissionais de saúde sobre a doença, suas formas de transmissão e diagnóstico pode resultar em graves.

consequências à saúde pública a longo prazo (Rassi e cols., 2010; Coura & Viñas, 2010; Bern e cols., 2011; Hotez e cols., 2013.) (Figura 1).

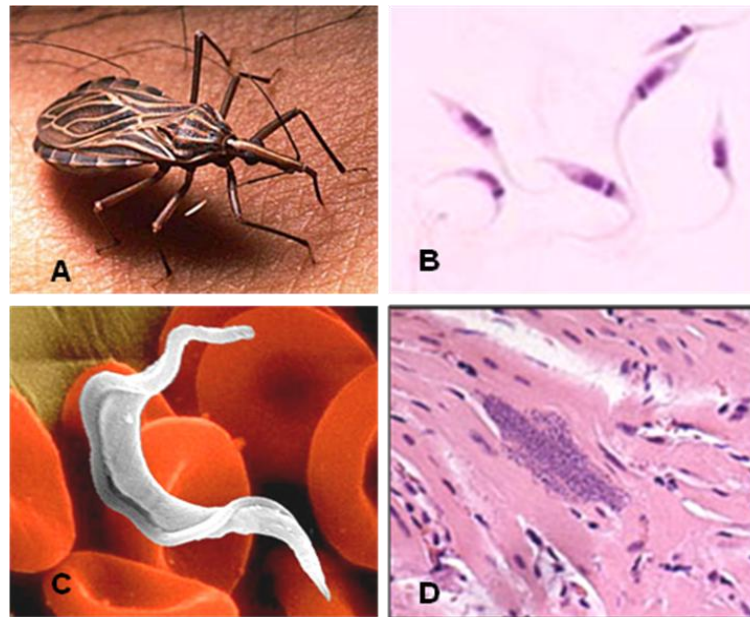


**Figura 1:** Estimativa do número de imigrantes infectados com *T. cruzi* em áreas não endêmicas (2004-2008) (Fonte: Rassi e cols., 2010)

### 1.1.1. Agente etiológico e ciclo evolutivo

O agente etiológico da doença de Chagas, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae), apresenta ciclo biológico heteroxênico e envolve, obrigatoriamente, passagens através de hospedeiros vertebrados (mamíferos distribuídos nas ordens: Edentata, Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Artiodactyla, Logomorpha, Chiroptera e Primata) e vetores invertebrados (triatomíneos hemípteros da família Reduviidae) (Brener, 1973). Nos hospedeiros invertebrados, o parasito está presente nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Nos hospedeiros vertebrados, este se apresenta nas formas tripomastigota sanguícola, encontrado no sangue circulante e, amastigota, esta última presente principalmente no interior de células nucleadas (Ley e cols., 1988, 1990; Rey, 2001, Figura 2).

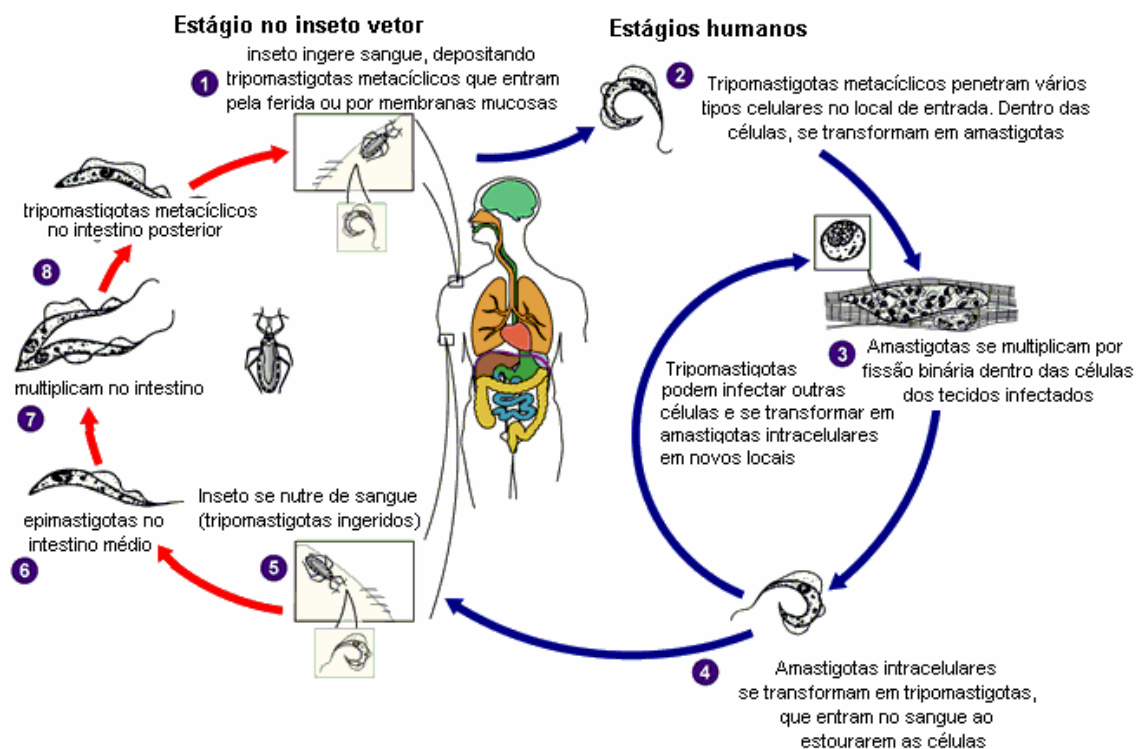




**Figura 2:** (A) Triatomíneo da espécie *Rhodnius prolixus*; (B) formas epimastigotas de *T. cruzi* ([www.cienciaviva.org.br](http://www.cienciaviva.org.br)); (C) forma tripomastigota de *T. cruzi* na corrente sanguínea, visto ao microscópio eletrônico (Imagem: Rubem Menna-Barreto); (D) formas amastigotas de *T. cruzi* interiorizadas em tecido muscular. ([www.uga.edu/cellbio/tarleton.html](http://www.uga.edu/cellbio/tarleton.html)).

O *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional multiclonal, além de elevada diversidade intraespecífica biológica, bioquímica e genética (Engel e cols., 1982; Barnabé e cols., 2000; Lewis e cols., 2009). Estes parasitos foram classificados dentro de seis unidades discretas de tipagem (DTUs) recentemente renomeadas a TcI-TcVI (Zingales e cols., 2009). O termo DTU foi proposto para descrever grupos de parasitos que são geneticamente mais similares uns aos outros que a qualquer membro de outro grupo, e são explorados para estudos de epidemiologia molecular e evolução (Tibayrenc, 1998). TcI é o mais abundante e disperso DTU nas Américas, encontrado tanto no ciclo domiciliar quanto no ciclo silvestre de *T. cruzi* e está associado principalmente à cardiomiopatia chagásica (Ramírez e cols., 2010). TcIII and TcIV estão geralmente associados ao ciclo silvestre, embora casos de infecção aguda tenham sido relatados na região Amazônica brasileira (Miles e cols., 1981; Monteiro e cols., 2010). TcII tem sido isolado principalmente de ciclos domésticos e pode estar associado tanto a manifestações cardíacas quanto digestivas da doença (Virreira e cols., 2006). Estudos comparativos de genética molecular têm demonstrado que TcV e TcVI são híbridos de TcII e TcIII, geralmente encontrados no ciclo domiciliar (Lewis e cols., 2011).

A transmissão do tripanosoma ocorre no momento do repasto sanguíneo do triatomíneo, quando este elimina juntamente com suas fezes e urina as formas tripomastigotas metacíclicas, que penetram no hospedeiro através das mucosas, principalmente ocular, ou escoriações já existentes na pele ou provocadas ao coçar a região da picada (Köberle, 1968; Kirchoff, 1993; Prata, 1994; Rey, 2001). No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em formas amastigotas no interior das células nucleadas, se multiplicando intensamente por divisão binária. Em um processo posterior de diferenciação, há o aparecimento de formas tripomastigotas, que são liberadas para a circulação sanguínea, após o rompimento das células hospedeiras e que podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo inseto vetor, dando assim continuidade ao ciclo (Prata, 2001) (Figura 3).



**Figura 3:** Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*  
(adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)).

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas conferida pela Organização

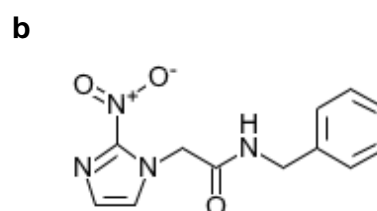
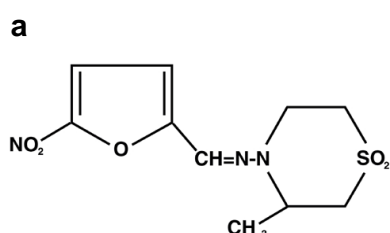
Pan-Americana da Saúde (OPAS) (Dias, 2006). Embora a transmissão pelo *T. infestans* esteja controlada no Brasil, outras espécies da subfamília Triatominae são potenciais vetores da doença, e podem ocupar o nicho da espécie eliminada (Schofield e cols., 2006). Além disso, nos últimos anos, os casos de surto por via oral têm se tornado cada vez mais frequentes, geralmente com quadros agudos severos (Steindel e cols., 2008). Neste tipo de infecção, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram no epitélio das mucosas, se transformam em amastigotas e se replicam intracelularmente. Mais da metade dos casos agudos da doença de Chagas, registrados na Amazônia brasileira entre 1968 e 2000, pode ser atribuída à transmissão por via oral através de alimentos contaminados (Coura e cols., 2002). Surto de doença de Chagas devido à ingestão de bebidas e alimentos contaminados também têm sido relatados nas regiões Sul (Silva e cols., 1968; Steindel e cols., 2008), e Nordeste do Brasil (Shikanai-Yasuda e cols., 1991; Bastos e cols., 2010) e em outros países da América do sul, tais como, Colômbia (Cáceres e cols., 1999; Hernández e cols., 2009) e Venezuela (Noya e cols., 2010; Marques e cols., 2013), e estão associados a elevadas taxas de mortalidade, principalmente devido à miocardite. Outras formas de transmissão da doença incluem a transfusional (Castro, 2009), congênita (Torrico e cols., 2007), acidentes em laboratório, principalmente pela via parenteral (revisto em Herwaldt, 2001), transplante de órgãos (Altclas e cols., 2008; Campos e cols., 2008) e amamentação (Bittencourt e cols., 1988; Rassi e cols., 2004). A doença de Chagas também tem sido reconhecida como uma doença oportunista em indivíduos portadores do vírus HIV (Hotez e cols., 2012).

### **1.1.2. Considerações gerais sobre a doença de Chagas**

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: aguda e crônica. Logo após a infecção, inicia-se a fase aguda da doença, geralmente com curta duração, que pode apresentar-se de forma assintomática ou com sintomas que variam desde dor de cabeça à miocardite intensa (em aproximadamente 10% dos casos). Se a infecção não for tratada, desenvolve-se a fase crônica sintomática em cerca de um terço dos indivíduos, após longo período de latência (10-30 anos), também conhecido como forma indeterminada. As principais manifestações clínicas da doença de Chagas incluem alterações digestivas e/ou cardíacas, embora alterações

no sistema nervoso central e periférico também possam ser percebidas (Rassi Jr e cols., 2010, 2012). Na forma crônica digestiva as manifestações clínicas são devido à disperistalse do esôfago e do colón causada pela destruição do plexo mioentérico levando à mega síndromes (Coura & Borges-Pereira, 2011). A forma crônica cardíaca é a manifestação clínica mais significativa incluindo cardiomiopatia dilatada, falha cardíaca congestiva, arritmias, cardioembolismo, e morte súbita (Machado e cols., 2012a,b). A patogenia da doença é caracterizada por processo inflamatório persistente, com resposta anti-parasitária e/ou autoimune, associado à baixa carga parasitária (Tarleton, 2003; Higuchi e cols., 2003; Rocha e cols., 2007; Marin-Neto e cols., 2008; Rassi e cols., 2009).

A partir da década de 50, diferentes séries de drogas foram testadas sem êxito em pacientes chagásicos e, somente a partir da década de 60 surgiram dois fármacos no mercado para tratamento desta patologia: os nitroderivados Nifurtimox (Figura 4a) e Benznidazol (Figura 4b). Nifurtimox (N3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneammina) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido), é um nitrofurano desenvolvido pela Bayer em 1967 e comercializado como Lampit®. Atualmente, Nifurtimox é produzido pela Bayer HealthCare em El Salvador. Benznidazol (BZ, N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) é um nitroimidazol desenvolvido pela Roche em 1972 e comercializado como Rochagan® ou Radanil®, mas atualmente tem sido produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Uma nova formulação pediátrica do BZ, fruto de uma parceria entre a DNDi e o LAFEPE está registrada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O tratamento é mais simples de ser administrado e é adaptado às crianças de até dois anos de idade. Ambas as drogas são efetivas contra a fase aguda da doença, no entanto, mostram pouca eficácia nas infecções crônicas (Coura & Borges-Pereira, 2011) e devido aos severos efeitos colaterais e limitada eficácia contra diferentes isolados (Brener e cols., 1993) ambos os nitroderivados estão longe de serem considerados a melhor opção de tratamento a ser oferecida aos pacientes.



**Figura 4:** Fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas (a)  
Nifurtimox, (b) Benznidazol

Os resultados obtidos com estes tratamentos variam de acordo com a fase da doença, a dose e o período de tratamento, bem como, a idade dos pacientes (Jannin & Villa, 2007). Em geral, os melhores resultados são obtidos em casos agudos da infecção, principalmente em crianças, estimando-se um percentual médio de cura parasitológica em torno de 60% (De Andrade e cols., 1996; Sosa-Estani e cols., 1998). A maior limitação destes compostos é a baixa atividade na fase crônica da doença. Além disso, estes dois nitroderivados apresentam efeitos colaterais sérios, sendo em alguns casos o tratamento é temporariamente suspenso ou mesmo abandonado. No caso de Nifurtimox incluem anorexia, emagrecimento, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas. No caso de BZ, dermatites com erupção cutânea, edema generalizado, febre, enfartamento ganglionar, dores articulares e musculares, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (Coura, 1996; Viotti e cols., 2009).

Tendo em vista o conhecimento acerca da eficácia versus toxicidade de ambos os compostos nitroderivados, a recomendação atual para o uso dos mesmos no tratamento da doença de Chagas são os casos agudos (incluindo reativação devido à imunossupressão), casos crônicos recentes (incluindo crianças de até 12 anos de idade), forma indeterminada ou crônica benigna, a critério do médico. Dentre as contraindicações para o tratamento destacam-se a gravidez, insuficiência renal ou hepática, doenças neurológicas não associadas a doença de Chagas e doença de Chagas em fase avançada com cardiopatia de grau III ou IV (OPS/OMS) (Coura, 2009).

Desde 1912 muitas tentativas terem sido feitas visando o tratamento da doença de Chagas, porém após a introdução de Nif e BZ, apenas alopurinol e os agentes fungicidas cetoconazol, fluconazol e itraconazol foram usados para tratar pacientes chagásicos em ensaios clínicos (Brener e cols., 1993; Apt e cols., 2005). Porém, em 2011, três ensaios clínicos de fase II começaram com o uso de posaconazol (um análogo estrutural do itraconazol) e E1224, uma pró-droga do ravuconazol. Ambos são derivados do triazol que inibem a enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase dependente de citocromo P-450 (CYP51) (Urbina, 2009). Dois estudos clínicos

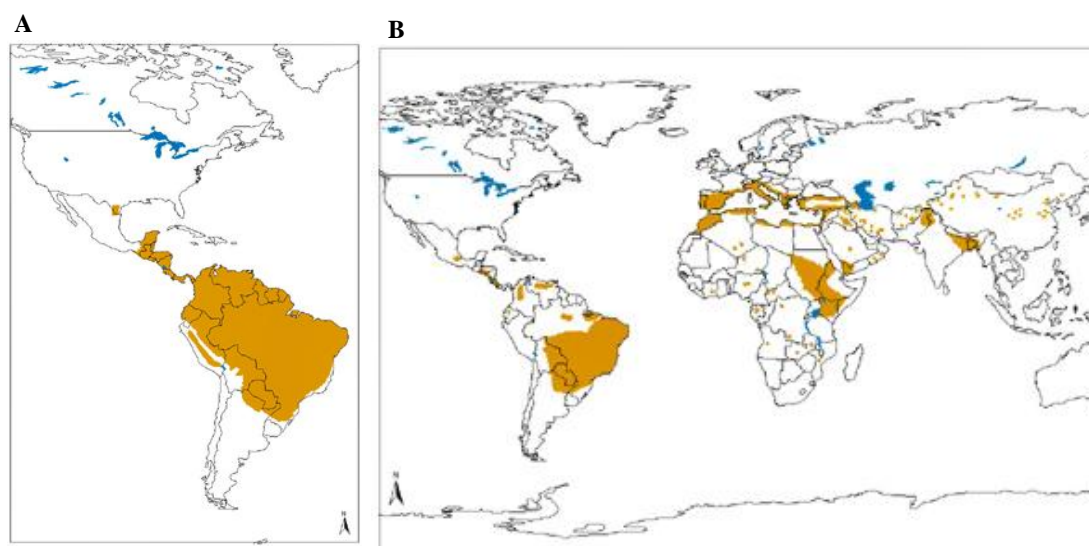
foram feitos com posaconazol, STOP-CHAGAS (em Argentina, Colombia, Mexico e Venezuela, financiado pela Merck) com resultados esperados até 2014 e CHAGASAZOL (na Spain, University Hospital Vall d'Hebron Research Institute em Barcelona) finalizado em Março 2013 (resultados não postados em <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01162967>, até o dia 4 de maio de 2014). O outro estudo usando o composto E1224 (DND/Eisai Pharmaceuticals), foi realizado na Bolívia, que se mostrou segura e eficaz na cura parasitária, porém tal eficácia não foi mantida após um ano de tratamento como uma medicação única. As principais desvantagens dos derivados azólicos, como o posaconazol, são sua complexidade e alto custo de produção (Urbina, 2009). Alguns exemplos de drogas em fase pré-clínica são o fexinidazol (5-nitroimidazol redescoberto pela DNDi e atualmente em estudo clínico de fase II/III para o tratamento da tripanosomíase africana) (Bahia e cols., 2012), análogos de diamidinas (Soeiro e cols., 2013), oxaborol (protótipo AN4169) e fenarimol (inibidores da CYP51) (Keenan e cols., 2013). Ainda, a vinilsulfona K777, inibidora de cisteína protease, inibe a cruzaina e tem mostrado eficácia em modelo murino de infecção crônica por *T. cruzi* e se encontra em fase de testes pré-clínicos (McKerrow e cols., 2009).

O monitoramento do curso da infecção por *T. cruzi* em modelo murino após o tratamento é de suma importância para a validação da eficácia de novas drogas. As técnicas mais comumente empregadas para se avaliar a carga parasitária neste modelo são a histopatologia e o PCR, que, em geral, estão sujeitas ao viés de amostragem. Ainda, o estudo do curso da infecção crônica por *T. cruzi in vivo* apresenta uma limitação que consiste na dificuldade de se detectar o parasito nos tecidos, já que a parasitemia é subpatente. Nos últimos anos, uma nova abordagem tem sido utilizada e parece bastante promissora. Trata-se da técnica de imagem por bioluminescência, baseada na detecção da luz emitida pelos parasitos que expressam a enzima luciferase. Esta técnica tem mostrado sensibilidade e acurácia na detecção de parasitos, de forma não invasiva. Ela tem sido aplicada não apenas em *T. cruzi* (Andriani e cols., 2011; Henriques e cols., 2014) como também em diferentes modelos de infecção, tais como *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma brucei* (Lang e cols., 2005; Myburgh e cols., 2013; Claser e cols., 2014) e representa um grande avanço no monitoramento em tempo real da eficácia de novas drogas antiparasitárias.

A necessidade de se encontrar alternativas mais seguras e eficazes para o tratamento da doença de Chagas tem levado diversos grupos a estudar a atividade tripanocida de compostos naturais e sintéticos (Campos e cols., 2010; Da Rocha e cols., 2013). Alvos moleculares em *T. cruzi* considerados promissores para o desenho de novas drogas incluem as enzimas hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, cisteína proteases e topoisomerasas (Wenck e cols., 2004; Sajid e cols., 2011; Zuma e cols., 2011), 14-desmetilase (revisto por Buckner, 2008), esqualeno sintase (Urbina, 2002; Sealey-Cardona e cols., 2007), farnesil pirofosfato sintase (Szajnman e cols., 2005), farnesil transferase (Hucke e cols., 2005; Kraus et al, 2009) e dihidrofolato redutase (Schormann et al, 2010). Propriedades tripanocidas de produtos naturais como quinolinas, naftoquinonas e lignanas também têm sido investigados (Schmidt e cols., 2012). Recentemente, um estudo do nosso grupo mostrou a toxicidade seletiva de derivados sintéticos de tiossemicarbazonas sobre formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em macrófagos humanos, encorajando posteriores estudos *in vivo* com este composto (Soares e cols., 2011).

## **1.2. Leishmanioses**

Em termos de saúde pública, as leishmanioses apresentam grande importância, uma vez que atingem principalmente indivíduos pobres, de países em desenvolvimento e está geralmente associada à mal nutrição e precárias condições de moradia e saneamento básico (Hepburn, 2003; Murray e cols., 2005). Esta protozoose ocorre em 98 países, estando aproximadamente 350 milhões de indivíduos sob risco de contraí-la (DNDI, 2014). Elas compreendem um grupo de doenças com diferentes aspectos e severidades, apresentando vasta distribuição geográfica, incluindo países da África, Ásia e América Latina (Ouainssi & Ouainssi, 2005).



**Figura 5A:** Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea do Novo Mundo; **Figura 5B:** Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Novo e Velho mundo. (Fonte: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en))

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitos de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, com diferentes distribuições geográficas e aspectos clínicos da infecção. Dentre as formas de leishmaniose destacam-se: a) cutânea, que causa lesões cutâneas ulceradas ou não, sendo a forma menos severa; b) mucocutânea, caracterizada por lesões na mucosa do nariz, boca e faringe; c) cutânea difusa, na qual se observam lesões múltiplas não ulceradas e disseminadas pelo tegumento; d) visceral, a forma mais grave, na qual são encontrados parasitos no interior de células fagocíticas mononuclear de órgãos como, baço, fígado e medula óssea. Exemplos de espécies de *Leishmania*, suas formas clínicas e localização geográfica predominante estão relatadas na Tabela 1.

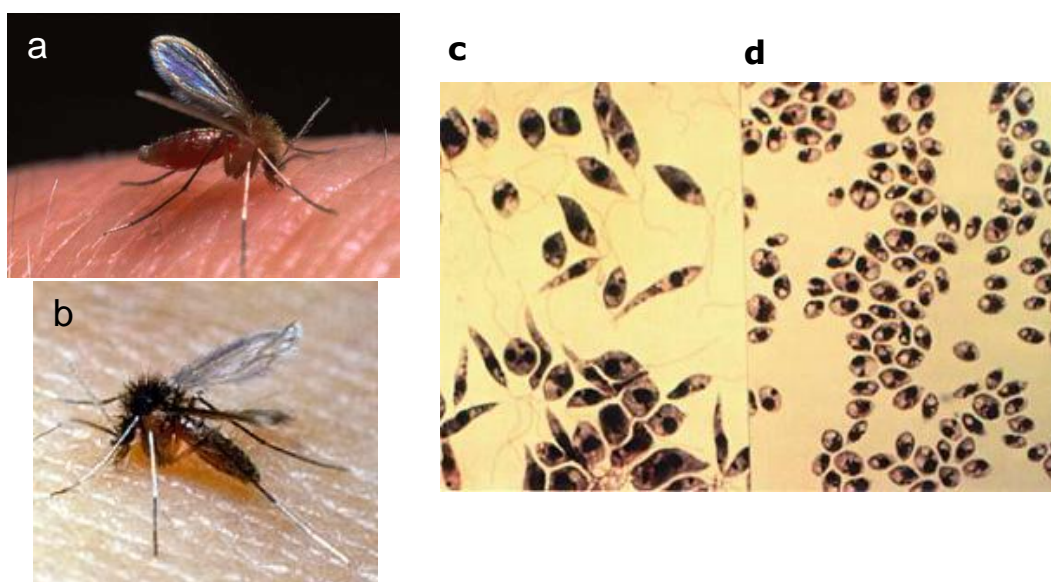
**Tabela 1.** Exemplos de leishmanioses do Novo Mundo, seus agentes etiológicos e distribuição geográfica (Adaptado de Luiz Rey, 2001).

| <b>Espécie de Leishmania</b>                     | <b>Forma clínica</b>      | <b>Distribuição geográfica</b>      |
|--|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>L. (Viannia) braziliensis</i>                 | Cutânea e mucocutânea     | América Central e do Sul            |
| <i>L. (V.) peruviana</i>                         | Predominantemente cutânea | Vales Andinos                       |
| <i>L. (V.) guyanensis</i>                        | Predominantemente cutânea | América do Sul                      |
| <i>L. (V.) panamensis</i>                        | Predominantemente cutânea | América Central                     |
| <i>L. Leishmania mexicana</i>                    | Cutânea e cutânea difusa  | México e América Central            |
| <i>L. (L.) amazonensis</i>                       | Cutânea e cutânea difusa  | América central e Brasil            |
| <i>L. (L.) infantum</i> = <i>L. (L.) chagasi</i> | Visceral (calazar)        | Sul do México ao Norte da Argentina |



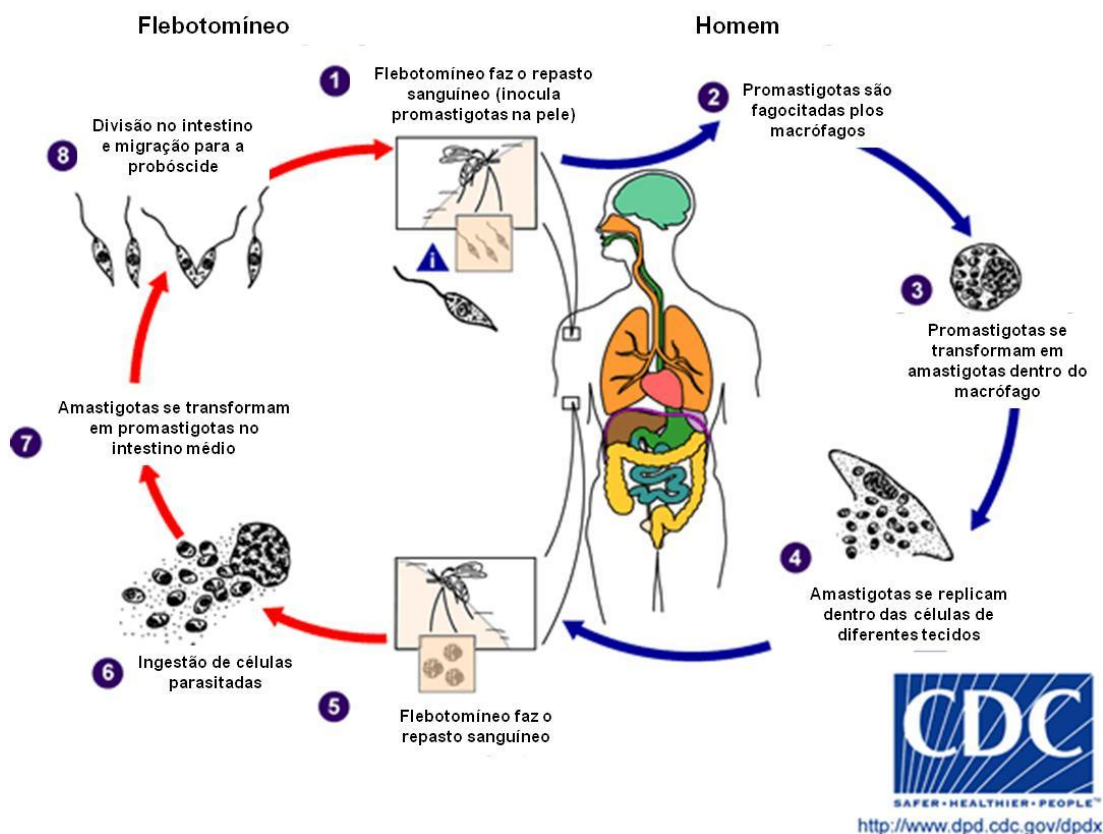
### 1.2.1. Agente etiológico e ciclo evolutivo

As leishmanias apresentam duas formas evolutivas distintas durante seu ciclo biológico: 1) a forma promastigota, alongada, fusiforme e com flagelo livre, desenvolvendo-se no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado; 2) a forma amastigota, arredondada e com flagelo intracelular, parasitando de maneira seletiva as células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Figura 6). Os hospedeiros invertebrados são dípteros da família Psychodidae pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo). Dentre os hospedeiros vertebrados, além do homem, são encontrados em diferentes mamíferos, tais como preguiças, tamanduás, marsupiais, roedores e caninos, dependendo da espécie do parasito (Rey, 2001).



**Figura 6:** a) Inseto vetor *Phlebotomus* sp., ([www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)); b) Inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. (Centre for Applied Entomology and Parasitology, 2005; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID, 2004); c) Formas promastigotas ([ohsu.org/microbiology/landfear.html](http://ohsu.org/microbiology/landfear.html)); d) Formas amastigotas ([ohsu.org/microbiology/landfear.html](http://ohsu.org/microbiology/landfear.html))

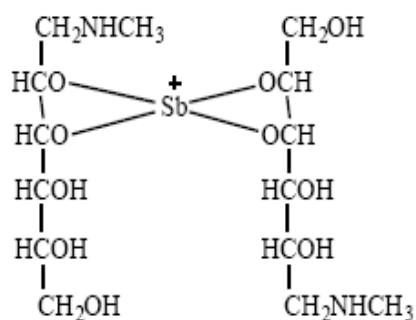
O ciclo do parasito se inicia quando o inseto vetor flebotomíneo inocula no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas, que se transformam em amastigotas no interior do fagolisosoma de macrófagos, se multiplicando por divisão binária. Esta multiplicação resulta na ruptura do macrófago e as amastigotas livres infectam novos macrófagos, propagando a infecção (Figura 7).



**Figura 7:** Ciclo de vida da *Leishmania* sp  
(adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)).

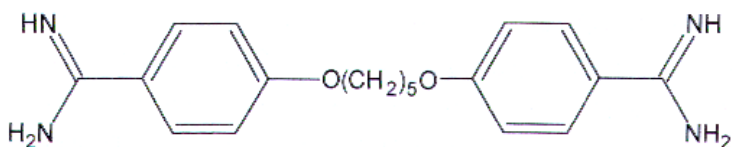
### 1.2.2. Considerações gerais as leishmanioses

As drogas recomendadas para o tratamento das leishmanioses, os antimoniais pentavalentes, foram primeiramente introduzidas na clínica, há cerca de 60 anos. No decorrer das últimas décadas, drogas alternativas ou novas formulações de outras drogas padrões, têm sido avaliadas e registradas, para uso em alguns países (Croft e cols., 2006). Ainda hoje, o tratamento continua baseado no uso dos antimoniais pentavalentes, complexados a carboidratos, na forma de estibogliconato de sódio (Pentostan), e antimoniato de meglumina (Glucantime) (Figura 8). No entanto, nos últimos anos, a eficácia do tratamento com os antimoniais pentavalentes tem sido prejudicada devido ao surgimento de resistência a estas drogas (Hadighi e cols., 2006; Yasinzi e cols., 2013).



**Figura 8:** Fórmula química do antimoniato de meglumina - Glucantime® (Croft e Yardley, 2002).

Dentre os medicamentos alternativos para o tratamento das leishmanioses, é usada a pentamidina (Figura 9) (Carvalho e cols., 2000). Porém a toxicidade tem sido um fator de limitação de seu uso, com casos já descritos de hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade e taquicardia (Jha, 1983; Soto-Mancipe e cols., 1993; Soeiro e cols., 2005) assim como outros efeitos adversos expressivos, como mialgia, hipotensão, dores de cabeça e náuseas (Berman, 1997).

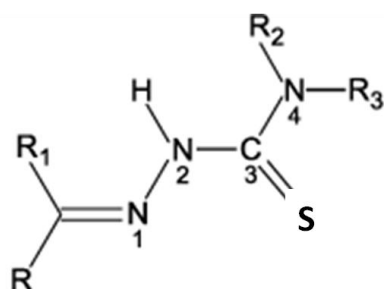


**Figura 9:** Estrutura química da pentamidina (Rath e cols., 2003).

### 1.3. Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas constituem uma classe de moléculas cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal. Dados da literatura mostram que elas apresentam um amplo perfil farmacológico (Figura 10), incluindo atividades anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, antibacterianas e antimaláricas (Muthukumar e cols., 2008; Glisoni e cols., 2012; Walcourt e cols., 2013; Khan e cols., 2014; Shao e cols., 2014). Além disso, a atividade seletiva de derivados de tiossemicarbazonas também já foi demonstrada sobre os

tripanosomatídeos *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania sp* (Caputto e cols., 2011; Britta e cols., 2012; Glinma e cols., 2014)



R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H, grupos alquila ou arila

**Figura 10:** Estrutura genérica das Tiossemicarbazonas (Beraldo, 2004)

Estes compostos são geralmente obtidos pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado (Hang e cols., 2001). São conhecidos, também, pelas suas propriedades para formarem complexos organometálicos, comportando-se como agentes quelantes (Gaal e cols., 2014). Apresentam como característica principal, do ponto de vista sintético, a alta facilidade de obtenção, assim como a vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (Du e cols., 2002).

A versatilidade farmacológica das tiossemicarbazonas se deve ao fato desses compostos agirem, como inibidores de enzimas, por interações com o DNA ou inibição de sua síntese. Greenbaum e colaboradores (2004) sugerem que o mecanismo de ação dessas moléculas seja complexo e deva ocorrer através da inibição de múltiplos alvos. As tiossemicarbazonas  $\alpha$ -(N)-heterocíclicas encontram-se entre os inibidores mais potentes da atividade da enzima ribonucleosídeo redutase (RR). Esta enzima existe em todas as células vivas e apresenta a função de catalisar a formação de deoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos, um fator limitante para a síntese de DNA. Assim, RR vem sendo relacionada como um alvo promissor na terapia do câncer e doenças parasitárias. De fato, o efeito anti-proliferativo de derivados de tiossemicarbazona contra *L. donovani* parece ser

mediado pelo bloqueio da síntese de DNA (Dodd e cols., 1989). Zhu e colaboradores (2009) mostraram que tiossemicarbazona 3-aminopiridine-2-carboxaldeido tiossemicarbazona (3AP), inibe a enzima RR de forma dose-dependente, e que tal efeito está correlacionado com a atividade antiproliferativa deste composto sobre células tumorais de nasofaringe. Além do efeito sobre RR, a atividade antitumoral da tiossemicarbazona 3-AP também parece estar relacionada à indução do estresse metabólico do retículo endoplasmático (Giles e cols., 2003; Trondl e cols., 2014). O efeito antiproliferativo de derivados de tiossemicarbazonas também já foi demonstrado sobre as células tumorais HeLa e MCF-7, pela atuação como agente intercalante de DNA (Sampath e cols., 2013).

Uma grande variedade de derivados de tiossemicarbazona têm sido sintetizadas e avaliadas contra cisteína proteases de parasitos, como, cruzaina (cruzipaína), falcipaína-2 e rhodesaina de, respectivamente, *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei* (Mallari e cols., 2008; Ettari e cols., 2010; Lima e cols., 2013). As cisteína proteases da superfamília da papaína desempenham papel fundamental na biologia de diferentes protozoários parasitos e a inibição das mesmas têm sido consideradas como uma interessante estratégia no combate a doenças parasitárias. Leite e colaboradores (2006) mostraram a atividade tripanocida de aril-tiossemicarbazonas sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Análises de *docking* molecular revelaram que a tiossemicarbazona apresenta alta especificidade de interação com a enzima cruzaina, corroborando o potencial desta classe de compostos como agente anti-*T. cruzi*. O estudo da atividade anti-*P. falciparum* de derivados de tiossemicarbazona complexados com ouro mostrou a associação entre a toxicidade sobre o plasmódio e a inibição da cisteína protease falcipaína-2 (Khanye e cols., 2010). Ainda, os resultados de modelagem por homologia da cisteína protease catepsina-like CPB de *L. mexicana* sugeriu que esta difere significativamente da catepsina B de bovinos e, portanto, pode ser um bom alvo para drogas. A triagem de diversos compostos contra CPB de *L. mexicana* identificou tiossemicarbazonas como potentes inibidores, que podem ser explorados como guias para o desenho de compostos antiparasitários (Schröder e cols., 2013).

Decorridas várias décadas de estudos relativos à doença de Chagas e às leishmanioses, ainda não existe tratamento realmente eficaz e atóxico para as

diferentes fases e formas destas parasitoses. Considerando o grande potencial das tiossemicarbazonas contra diferentes protozoários parasitos, além de sua atuação em diversos alvos bioquímicos, torna-se importante o estudo de novos compostos desta classe, como possíveis drogas para o tratamento dessas tripanosomíases.

Recentemente, o grupo da Dra. Áurea Echevarria (Laboratório de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro) sintetizou diferentes derivados de tiossemicarbazonas que têm sido alvo de estudo pelo nosso grupo, dentre eles: **a**) 4-N-(2'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (2-MEOTIO) e **b**) 4-N-(4'-hidroxi-3'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (3-MEOTIO) (Figura 11). O efeito destes derivados sobre os tripanosomatídeos *T. cruzi* e *L. amazonensis* foi investigado. Em *T. cruzi*, foram testados sobre formas tripomastigotas obtidas a partir de cultura de células e/ou amastigotas intracelulares em macrófago murino e humano. O derivado 2-MEOTIO foi o mais ativo e possui atividade seletiva sobre formas intracelulares de *T. cruzi*, sendo considerado um composto promissor para o tratamento *in vivo* da doença de Chagas (Soares e cols., 2011). Em *L. amazonensis*, o composto 3-MEOTIO mostrou-se o mais ativo contra formas promastigotas em concentrações não tóxicas para a célula hospedeira (Soares e cols., 2014, a ser submetido). No entanto, o tratamento prolongado com tiossemicarbazonas é capaz de induzir resistência, como foi visto em células tumorais, o que reduz a eficácia destes compostos. Nestas células, a resistência a tiossemicarbazonas têm sido associada à superexpressão do gene *mdr1*, o qual codifica para a glicoproteína-P (Rappa e cols., 1997; Liu e cols., 2009).

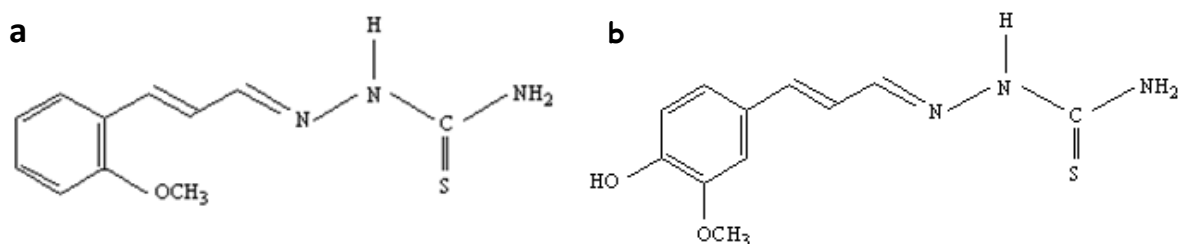


Figura 11: Estruturas das tiossemicarbazonas usadas no presente estudo: (a) 4-N-(2'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (2-MEOTIO); (b) 4-N-(4'-hidroxi-3'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (3-MEOTIO).

#### 1.4. Mecanismos de resistência a drogas

A resistência a drogas é um grave problema que reduz a eficácia do tratamento de diferentes microorganismos de importância médica. Ela pode estar relacionada a diferentes processos, tais como, a diminuição da ativação da droga, aumento da expressão da molécula alvo e mecanismos de efluxo de drogas mediados por transportadores de membrana (bombas de efluxo). Além disso, redução na captação de drogas, modificações no próprio alvo também têm sido descritas como possíveis mecanismos de resistência (Yasinzai e cols., 2013).

A análise proteômica de cepas de *T. cruzi* resistentes ao BZ, utilizando eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas, revelou a expressão diferencial de cisteína proteases, peroxirredoxina, ciclofilina A, glutamato desidrogenase, dentre outras (Andrade e cols., 2008). O aumento da expressão da enzima ascorbato peroxidase, que atua na detoxificação de peróxido de hidrogênio, foi observado em populações de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ou *in vivo* ao benznidazol (Nogueira e cols., 2012). As enzimas álcool-desidrogenases constituem uma classe de oxirredutases importantes no metabolismo do etanol, catalisando a oxidação do etanol a acetaldeído. Estudo realizado em cepas de *T. cruzi* resistentes ao BZ mostrou a associação do fenótipo de resistência com a diminuição da transcrição gênica e da expressão desta enzima no parasito (Campos e cols., 2009). A resistência cruzada entre compostos nitroheterocíclicos em *T. cruzi* tem sido associada à perda de cópia do cromossomo contendo o gene da nitrorredutase do tipo I (TcNTR) e/ou a mutações neste gene (Wilkinson e cols., 2008; Mejia e cols., 2012). No entanto, a suscetibilidade natural de *T. cruzi* ao BZ não está associada a variações na sequência do gene TcNTR (Mejia e cols., 2012), indicando que outros mecanismos também pode operar na resistência a drogas neste parasito.

Em *Leishmania*, diferentes mecanismos de resistência a drogas já foram descritos, incluindo proteínas da membrana plasmática envolvidas na captação de antimoniais pentavalentes como a aquagliceroporina (Gourbal e cols., 2004; Mandal e cols., 2010) e a proteína de resistência a múltiplas drogas (MRPA) (Moreira e cols., 2013). A resistência natural de cepas de *L. infantum* ao antimonial pentavalente

Glucantime está associada à redução da expressão de calcineurina, uma enzima que atua na transdução de sinais e participa do processo de apoptose. Os autores sugerem que a diminuição da expressão de calcineurina pode proteger os parasitos da apoptose induzida pelo Glucantime (Bagher e cols., 2013). O estudo de expressão diferencial de proteínas em *L. panamensis* resistente e suscetível a antimoniais mostrou o aumento da expressão de proteínas de choque térmico, enolase, cisteína protease, dentre outras (Peláez e cols., 2012). Ainda, trabalhos na literatura têm descrito o papel da proteína de membrana glicoproteína-P no mecanismo de resistência a drogas em *Leishmania sp* (Chiquero e cols., 1998; Mary e cols., 2010).

No presente estudo, focamos na investigação da participação de duas proteínas no mecanismo de resistência a drogas nos tripanosomatídeos *T. cruzi* e *L. amazonensis*: a glicoproteína-P (Pgp) e a nitrorredutase do tipo I (TcNTR).

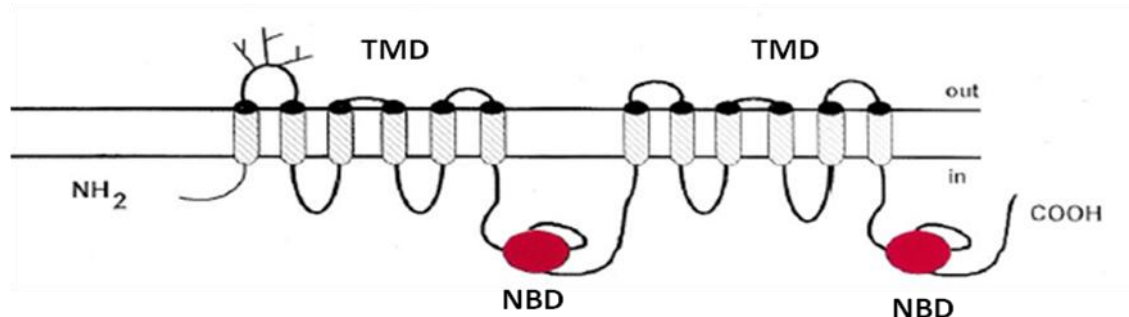
#### **1.4.1 Glicoproteína-P**

A Pgp é uma proteína transmembrana (150-170 kDa), pertencente à superfamília dos transportadores ABC (*ATP binding cassette*). Ela consiste de duas metades homólogas contendo o domínio transmembrana (TMD) e o domínio hidrofílico, que é o domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) (Figura 12). A Pgp atua como uma bomba de efluxo dependente de energia transportando, através da membrana, uma variedade de compostos estruturalmente não-relacionados (Higgins, 1992; Gottesman & Pastan, 1993). A Pgp (ABCB1) transporta centenas de compostos anfipáticos hidrofóbicos não relacionados estruturalmente, incluindo drogas terapêuticas, peptídeos e lipídeos, e desempenha um papel importante na proteção da célula contra xenobióticos e metabólitos endógenos (Sharom e cols., 2011).

Apesar dos avanços no conhecimento sobre a estrutura e funcionalidade da Pgp ainda existe uma lacuna na literatura acerca de como esta proteína atua ao nível molecular. Estudos sugerem que o domínio TMD é o sítio de ligação ao substrato, e que a ligação do ATP no domínio NBD causa mudanças conformacionais no domínio TMD da proteína, alterando o seu estado de alta afinidade pelo substrato para baixa afinidade, permitindo o efluxo do mesmo



(Sonveaux et al., 1999; Rosenberg e cols., 2003). O transporte de substâncias através da Pgp pode ocorrer tal como uma bomba de vácuo hidrofóbica que irá expelir o substrato para um meio aquoso, ou pelo movimento de "flipase" no qual a Pgp transporta o substrato da camada interna para a externa da membrana celular. Estudos cristalográficos da Pgp mostram ainda que drogas interagem com esta proteína no domínio TMD em um sítio de ligação amplo e flexível capaz de acomodar diferentes substratos ao mesmo tempo (Sharom, 2011, 2014).



**Figura 12:** Estrutura geral da Pgp na membrana plasmática da célula. A posição dos carboidratos está representada pelas pequenas árvores, o domínio transmembrana (TMD) está indicado pelos círculos pretos, e o domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD), pelo círculo vermelho (adaptado de Borst e cols., 2000).

Uma das principais causas de falhas terapêuticas no tratamento do câncer é a emergência de resistência a múltiplas drogas, o conhecido fenótipo MDR (*multidrug resistance*) o qual está principalmente associado à superexpressão da Pgp (Shustik e cols., 1995; Leonard e cols., 2003; Abraham e cols., 2014). A resistência a drogas mediada pela Pgp também tem sido relatada em protozoários parasitos como *Entamoeba histolytica* (Descoteaux e cols., 1995) e *Plasmodium sp* (Wilson e cols., 1993; Suwanarusk e cols., 2008). Em *Leishmania sp* genes *mdr-like*, homólogos ao MDR1 em humanos, foram descritos em *L. donovani* (LdMDR1) (Hendrickson e cols., 1993), *L. enrietti* (LeMDR1) (Wong e cols., 2006), *L. mexicana* (LmMDR1) *L. amazonensis* (LaMDR1) (Katakura e cols., 1999) e *L. tropica* (LtrMDR1) (Chiquero e cols., 1998). A indução de resistência em diferentes espécies do gênero *Leishmania* ao composto vinblastina resultou na amplificação do gene *mdr1* além de resistência cruzada com outros compostos tais como puromicina e daunomicina (Henderson e cols., 1992; Chow e cols., 1993; Gueiros-Filho e cols., 1995). Mary e colaboradores

(2010) demonstraram que a amplificação do gene *mdr1* em isolados clínicos de leishmaniose visceral é um evento bastante frequente em parasitos isolados do campo, que não foram submetidos à ação de drogas, e este fenótipo pode ser selecionado durante o tratamento, levando à resistência a drogas. Mais recentemente, Messaritakis e colaboradores (2013) mostraram a correlação entre o aumento da expressão da Pgp, elevados níveis de atividade de efluxo de rodamina 123 e resistência ao Glucantime em diferentes isolados de *L. infantum* e *L. donovani*.

Em *T. cruzi*, foram identificados dois genes que codificam para a glicoproteína-P, o *TcPGP1* e o *TcPGP2*. A caracterização molecular do gene *TcPGP1* por Torres e colaboradores (1999) revelou a ausência de dois segmentos transmembrana (11<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup>) e do segundo domínio NBD, devido a inserção de um retrotransposon, e codifica para uma proteína de 115 kDa. O gene *TcPGP2* é expresso em uma única cópia em formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e codifica para uma proteína de aproximadamente 170 kDa que apresenta os mesmos domínios TMD e NBD encontrados nos transportadores ABCB1, descritos na literatura (Dallagiovanna e cols., 1996). O papel da Pgp no parasito não está elucidado, mas já foi sugerida sua participação no transporte de heme através da membrana plasmática de *T. cruzi* (Lara e cols., 2007; Cupello e cols., 2011). Em um estudo sobre a resistência ao BZ em diferentes cepas de *T. cruzi*, não foi identificada a amplificação gênica ou superexpressão dos genes *TcPGP1* ou *TcPGP2* nas cepas resistentes (Murta e cols., 2001). Em contrapartida, Neal e colaboradores (1989) observaram que a resistência ao Nifurtimox em um clone de *T. cruzi* foi revertida quando os parasitos foram tratados com esta droga em combinação com o inibidor da Pgp verapamil, sugerindo a participação desta proteína no mecanismo de resistência a drogas em *T. cruzi*.

Nas últimas décadas, diversos substratos da Pgp foram identificados, incluindo agentes quimioterápicos, produtos naturais, e marcadores fluorescentes (Wang e cols., 2013; Zeino e cols., 2014). O efeito destes substratos na inibição da atividade da Pgp tem sido explorado no intuito de reverter o fenótipo MDR, no entanto, entender o mecanismo pelo qual ocorre esta inibição ainda é um desafio. Os moduladores da Pgp podem atuar por inibição competitiva interagindo com o sítio de ligação ao substrato, como por exemplo, a rodamina 123, ou alostericamente,

previnindo a translocação e dissociação do substrato. Alguns interagem no sítio de ligação com o ATP, desta forma, inibindo a atividade ATPásica, como é o caso de alguns flavonóides (Maki e cols., 2003; Zeino e cols., 2014).

A localização subcelular da Pgp também tem sido alvo de estudo uma vez que pode trazer informações importantes acerca do seu papel no processo de resistência a drogas. Estudos mostram que a Pgp está localizada predominantemente na membrana plasmática, onde atua como bomba de efluxo. No entanto, trabalhos têm mostrado sua presença em outros compartimentos como núcleo (Baldini e cols., 1995), retículo endoplasmático (Fu e cols., 2004), endossomo (Kim e cols., 1997), mitocôndria (Solazzo e cols., 2006), lisossomo (Fu e cols., 2007) e aparelho de Golgi (Molinari e cols., 1998). No entanto, a função que esta proteína desempenha nestas organelas, sobretudo no fenótipo de resistência a drogas, precisa ser melhor elucidada.

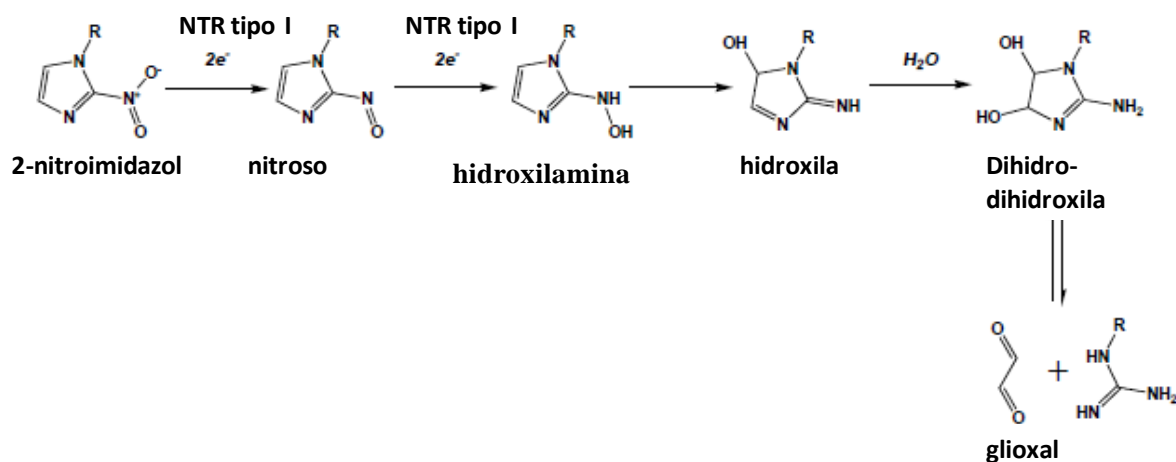
Deste modo, o estudo da Pgp em *T. cruzi* e *L. amazonensis* pode fornecer informações relevantes sobre a função dessa proteína no mecanismo de resistência a múltiplas drogas neste parasitos.

#### **1.4.2 Nitrorredutases**

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas Nifurtimox e BZ são compostos nitroheterocíclicos que apresentam um grupo nitro ligado a um anel furano e a um anel imidazol, respectivamente. Tratam-se de pró-drogas que precisam ser ativadas para que tenham efeito citotóxico. O processo chave desta ativação é a redução do grupo nitro catalisada pela enzima nitrorredutase (NTR). As nitrorredutases são encontradas em bactérias e em tripanosomatídeos, e por estarem ausentes em células de mamíferos, elas são consideradas um interessante alvo para drogas tripanocidas. Duas classes de NTRs foram descritas em tripanosomas: NTRs do tipo I e NTRs do tipo II.

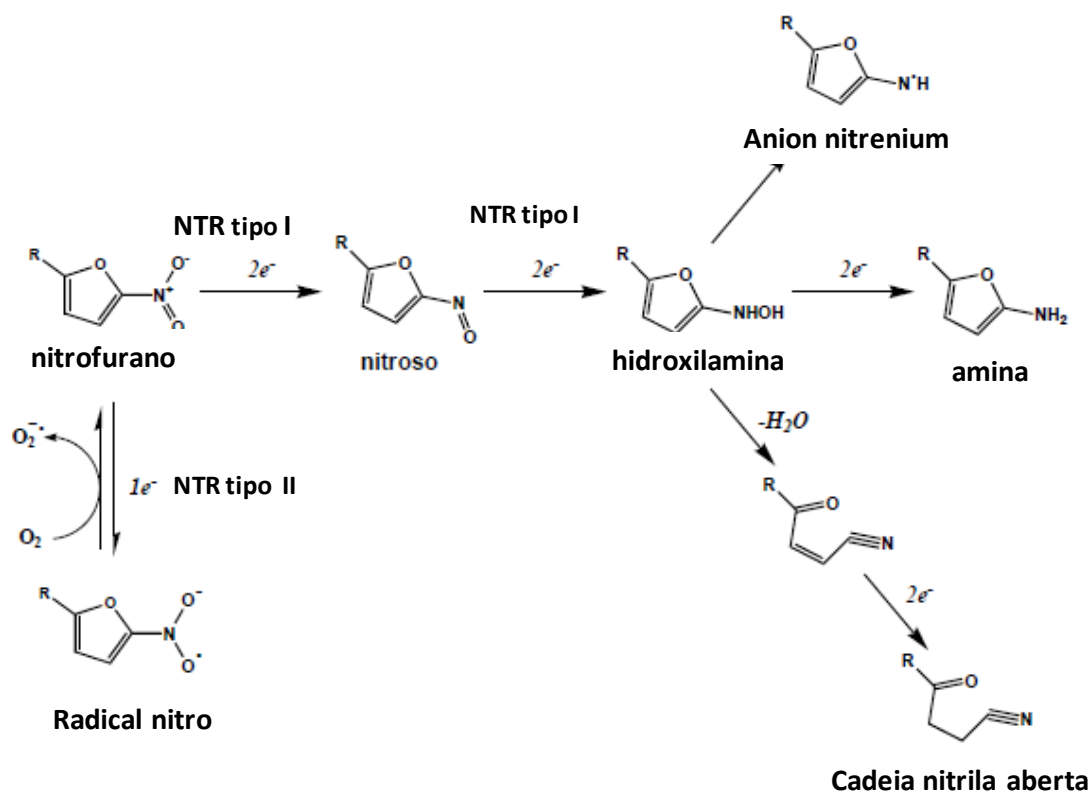
As NTRs do tipo I catalisam a redução do grupo nitro do composto nitroheterocíclico a uma hidroxilamina, utilizando o FMN como cofator e o NADPH como doador de elétrons. No caso do BZ, a hidroxilamina sofre rearranjo e

hidratação dando origem ao dihidro-dihidroxi-imidazol o qual pode ser decomposto liberando o glioxal, dialdeído altamente reativo, capaz de formar adutos com o DNA e tíois (Hall e cols., 2012) (Figura 13). Os tripanosomatídeos *Leishmania* spp. e *T. cruzi* possuem um sistema de detoxificação deste dialdeído, o sistema glioxalase tiol-dependente, o qual consiste das enzimas glioxalase I (lactoilglutationa liase) e glioxalase II (hidroxiacilglutationa liase) (Vickers e cols., 2004; Greig e cols., 2006). Trata-se de metaloenzimas que atuam em eventos sequenciais levando à detoxificação do metilglioxal, um substrato fisiológico derivado da glicólise. Por analogia, é possível que a enzima glioxalase I em *T. cruzi* atue na detoxificação do hemitioacetal, formado pela ativação do BZ, levando à sobrevivência dos parasitos. Portanto, seria interessante avaliar o papel da enzima glioxalase I no mecanismo de resistência ao BZ em *T. cruzi*.



**Figura 13:** Redução de 2-nitroimidazóis pela nitrorredutase do tipo I (adaptado de Hall e cols., 2012).

Quando o nitroheterocíclico é o nitrofurano, a hidroxilamina pode ser metabolizada em diferentes produtos: 1) anion nitrenium, capaz de promover quebra de DNA, 2) redução para a forma amina, 3) clivagem do anel furano formando cadeia aberta nitrila insaturada (Hall e cols., 2011) (Figura 14). Tendo em vista que a redução do grupo nitro mediada pelas nitrorredutase do tipo I não envolve a participação do oxigênio e não resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, estas enzimas são chamadas de "insensíveis ao oxigênio". Duas NTRs do tipo I foram identificadas em *T. cruzi*: prostaglandina F2 $\alpha$  sintase (Kubata e cols., 2002), que atua na redução de elétrons em condições anaeróbicas; e a NTR mitocondrial (Wilkinson e cols., 2008), a qual exerce papel central na ativação de nitroderivados.



**Figura 14:** Redução de nitrofuranos pelas NTRs dos tipos I e II.

Em contrapartida, as NTRs do tipo II utilizam o FAD e FMN como cofatores e são "sensíveis ao oxigênio". A redução do grupo nitro leva a formação de radical nitro altamente instável. Este radical inicia um ciclo redox com o oxigênio molecular, o que leva à formação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e regeneração da pró-droga nitrofurânica. O ânion superóxido é então dismutado a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pela enzima superóxido dismutase. Na presença de íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  formam o radical livre hidroxila (reação de Haber-Weiss), o qual pode se ligar a lipídeos, proteínas e DNA, levando à morte do parasito (revisto em Maya e cols., 2007). Este tipo de ativação não tem sido atribuída ao BZ, que parece ser dependente da NTR tipo I (Hall e cols., 2011).

Devido à via comum de ativação dos compostos BZ e Nifurtimox pela enzima NTR tipo I, a resistência cruzada entre estes compostos pode ser facilmente induzida em laboratório (Wilkinson e cols., 2008; Mejia e cols., 2012), e resulta em graves implicações para o tratamento da doença de Chagas. Desta forma, torna-se importante a investigação do papel da NTR tipo I no mecanismo de resistência ao BZ em *T. cruzi*.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Considerando a relevância de se conhecer o mecanismo de resistência a drogas nos tripanosomatídeos *T. cruzi* e *L. amazonensis*, o presente estudo tem como objetivo investigar a indução de resistência *in vitro* a tiossemicarbazonas e/ou BZ. O papel das seguintes proteínas no mecanismo de resistência será avaliado: glicoproteína-P (*T. cruzi* e *Leishmania amazonensis*); nitroredutase do tipo I (*T. cruzi*) e glioxalase I (*T. cruzi*).

1. Avaliação da atividade tripanocida de derivados de tiossemicarbazona sobre epimastigotas de *T. cruzi* e indução de resistência nestas formas pelo derivado mais ativo e pelo BZ;
2. Avaliação da manutenção da resistência, após os processos de diferenciação de *T. cruzi*;
3. Avaliação da expressão e atividade da Pgp nas populações de *T. cruzi* parental e resistentes a tiossemicarbazonas e ao BZ;
4. Localização subcelular da Pgp em *T. cruzi* e *L. amazonensis* resistentes e não-resistentes a tiossemicarbazonas e ao BZ;
5. Verificar a participação da enzima nitroredutase tipo I (TcNTR) na resistência ao BZ em clones da cepa Y de *T. cruzi*;
6. Avaliar o papel da enzima glioxalase I, atuante na detoxificação de glioxal, metabólito tóxico gerado pela ativação do Bz por NTR tipo I, na suscetibilidade de *T. cruzi* a esta droga

## **3. CAPÍTULO 1**



O **Capítulo 1** corresponde ao artigo publicado na Parasitology Research no qual o objetivo principal foi a investigação da expressão e atividade de efluxo da glicoproteína-P (Pgp) em populações de *T. cruzi* submetidas à indução de resistência *in vitro* a 4-N-(2-metoxiestiril)-tiossemicarbazona (2-MEOTIO) e BZ, verificando a estabilidade da resistência ao longo do ciclo evolutivo dos parasitos. Após a indução de resistência, o valor de EC<sub>50</sub> obtido para o tratamento de epimastigotas com os compostos 2-MEOTIO e Bz apresentou um aumento de pelo menos 4.7 vezes e, este fenótipo foi mantido após a diferenciação dos parasitos a tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas derivados de células, e amastigotas intracelulares. Epimastigotas resistentes a ambos os compostos mostraram aumento do efluxo de rodamina 123, maior atividade ATPásica da Pgp, resistência cruzada com moduladores da Pgp e reversão da resistência na presença de inibidores da Pgp, além de aumento da expressão dos genes *TcPGP1* and *TcPGP2*, comparado à população parental. Em suma, o fenótipo de resistência aos compostos 2-MEOTIO e BZ em *T. cruzi* é estável durante todo o ciclo evolutivo do parasito e conta com a participação da bomba de efluxo Pgp. A indução de resistência a drogas em *T. cruzi* consiste em um modelo importante não apenas no estudo do acerca do mecanismo envolvido nesta resistência, como também, no teste de novas drogas tripanocidas. O conhecimento sobre o mecanismo pelo qual *T. cruzi* é capaz de resistir à ação das drogas faz-se necessário para posteriores estudos que visam a busca de novos alvos e/ou associação de drogas para o tratamento da doença de Chagas.

Campos MC, Castro-Pinto DB, Ribeiro GA, Berredo-Pinho MM, Gomes LH, da Silva Bellieny MS, Goulart CM, Echevarria A, Leon LL. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. Parasitol Res, 2013,112(6): 2341-51.

## **4. CAPÍTULO 2**

O **Capítulo 2**, corresponde a um manuscrito a ser submetido à publicação no Journal of Parasitology no qual o objetivo principal foi relatar a expressão e a purificação da bomba de efluxo glicoproteína-P (Pgp) recombinante de *T. cruzi* (TcPGP2) e *L. amazonensis* (LaMDR1), bem como, a localização subcelular da Pgp nestes parasitos. Em *T. cruzi*, a expressão da Pgp em parasitos resistentes aos compostos tiossemicarbazona ou BZ está associada não apenas na membrana plasmática, como também, na mitocôndria do parasito, sugerindo a atuação da Pgp no transporte de drogas para fora desta organela. Em *L. amazonensis*, promastigotas resistentes a tiossemicarbazona, que apresentam aumento da expressão da Pgp, observou-se a presença deste transportador em uma organela localizada na porção anterior do parasito, a qual deve ser investigada em futuros estudos. Este trabalho mostra pela primeira vez a localização subcelular da Pgp em parasitos resistentes e não resistentes a drogas em *T. cruzi*. A obtenção de anticorpos anti-Pgp para os tripanosomatídeos *T. cruzi* e *L. amazonensis* descritos neste trabalho podem ser aplicados em diferentes técnicas que visem a melhor compreensão do mecanismo de ação da Pgp no fenótipo de resistência a drogas nestes parasitos.

Campos MCO, Berredo-Pinho MM, Echevarria A, Reis C, Leon LL, Castro-Pinto DB. Immunolocalization of P-glycoprotein in drug resistant trypanosomatids, a ser submetido à publicação.

## Short Communication

### **Immunolocalization of P-glycoprotein in drug resistant trypanosomatids**

Mônica Caroline Oliveira Campos<sup>1</sup>; Márcia Moreira Berredo-Pinho<sup>2</sup>; Renata Oliveira de Araújo Soares<sup>1</sup>; Áurea Echevarria<sup>3</sup>; Christian Reis<sup>4</sup>; Leonor Laura Leon<sup>1</sup> and Denise Barçante Castro-Pinto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife, PE 50670-420, Brazil

## Abstract

Chagas disease and Leishmaniasis, caused by protozoan parasites, are tropical neglected diseases with millions of people either infected or at risk of infection, causing significant morbidity and mortality, mainly in the developing countries. The current drugs available for these diseases are up to now unsatisfactory and drug resistance is also a critical problem for the success of the treatments. In several protozoa parasites drug resistance has been associated with P-glycoprotein (ABCB1), one of the most studied members of ABC family. Here we report the expression and purification of the recombinant *TcPGP2* and LaMDR1 proteins of *T. cruzi* and *L. amazonensis*, respectively, the production of specific antibodies and the immunolocalisation of Pgp in these parasites. We showed for the first time the subcellular localization of *TcPGP2* in *T. cruzi*. Drug resistance to Benznidazole and to the compound 4-N-(2'-methoxy styryl)-thiosemicarbazone in *T. cruzi* is associated with the expression of P-glycoprotein in the plasma membrane, as well as, in the mitochondria, suggesting that Pgp pumps the drug out of the organelle. In *L. amazonensis*, apart from the plasma membrane, the overexpression of Pgp in thiosemicarbazone-resistant promastigotes was observed at a specific location in the posterior region of the cell and should be further investigated. The anti-*L. amazonensis* and anti-*T. cruzi* Pgp sera reported here may be applied for several immunological techniques aiming to elucidate the contribution of P-glycoprotein to drug resistant phenotype.

Keywords: *L. (L.) amazonensis*, *T. cruzi*, P-glycoprotein, drug resistance, immunolocalisation

Chagas disease and leishmaniasis, caused by protozoan parasites, are considered relevant neglected diseases with millions of people either infected or at risk of infection, causing significant morbidity and mortality, mainly in the developing countries (DNDi, 2014). The current drugs available for specific treatment of those pathologies are up to now unsatisfactory due to limited effectiveness and/or toxic side effects (Castro et al 2006; De Oliveira et al., 2009). Drug resistance is also a critical problem for the success of the treatment, not only due to the existence of *T. cruzi* naturally resistant strains (Filardi & Brener 1987), but also due to the fact that resistance to Nifurtimox and Benznidazole, nitroheterocyclic compounds used to treat Chagas disease, may be induced during maintenance of the parasite *in vitro* (Nirde e cols., 1995; Villarreal e cols., 2005) or *in vivo* (Murta and Romanha, 1998) under drug pressure. Similarly, resistance to pentavalent antimonials, which have been the mainstay of treatment of both visceral and cutaneous leishmaniasis during the last 60 years, has been associated with treatment failures (Halder et al., 2011).

ATP binding cassette (ABC) transporters represent an important superfamily of large proteins which are able to translocate a wide range of substrates across membranes in an ATP-dependent process (Higgins, 2001). P-glycoprotein (ABCB1) is one of the most studied members of ABC family and has been associated with drug resistance in protozoa parasites, such as *Toxoplasma gondii* (Schmid et al 2009), *T. cruzi* (Campos et al., 2013) and *L. amazonensis* (Gueiros-Filho et al, 1995). The investigation of the subcellular localization of P-glycoprotein in drug resistant pathogenic trypanosomatids is important for accessing the mechanism by which this transporter participates in drug resistance. In the present study we focused on the immunolocalization of P-glycoprotein in wild type and Benznidazole and/or thiosemicarbazone resistant *T. cruzi* and *L. amazonensis* parasites.

Epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) from parental and drug resistant lines M15 (resistant to 4-N-(2'-methoxy styryl)-thiosemicarbazone) (2-MEOTIO) and B15 (resistant to Benznidazole) obtained as previously described (Campos et al., 2013) were maintained by weekly passages in *Liver Infusion Tryptose* medium (LIT) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/77LTB0016 strain) were cultivated at 28°C in Schneider's Insect Medium supplemented with 20% FBS. Parasites resistant to the thiosemicarbazone 3-MEOTIO (LA10) and the parental counterpart were evaluated in the present study. The induction of resistance was performed by culturing promastigotes in the presence of drug at the concentration corresponding to the

IC<sub>50</sub>/24h (281 μM). The *L. amazonensis* resistant phenotype (LA10) was characterised by the increase in 2.5-fold in the IC<sub>50</sub>, compared to the parental population.

The selection of sequences for designing the recombinant P-glycoprotein (Pgp) of *T. cruzi* and *L. amazonensis* was performed according to Chiquero and collaborators (1998). The linker region of Pgp, which links the two homologous halves of the protein, is one of its least conserved regions and guarantees specificity for antibody binding. The linker region of the genes *TcPGP2* and *LaMDR1* from *T. cruzi* and *L. amazonensis*, respectively, were selected for the preparation of a polyclonal antibody. To obtain the exactly amino acid sequence for the peptide synthesis, based on the sequence used for antibody production in *L. tropica* (Chiquero et al., 1998), we performed the alignment of P-glycoprotein from *L. tropica*, *T. cruzi* and *L. amazonensis* access numbers AAB69130, CAA89197, BAA76299, respectively, using the software MegAlign 7.0.0, DNASTar Program. The antigenic construction obtained was optimized prior to expression in *Escherichia coli*, using the genetic algorithm of LETO 1.0 Program (Entelechon). Then, the sequences were fused to two multiple cloning sites: 5' (Nhe I, Hind III) and 3' (XhoI, KpnI), sent to commercial synthesis (Genscript®), subcloned into the vectors pRSETA (Invitrogen®) and pET21d (Novagen®). Competent bacteria BL21 Star (Invitrogen®) were transformed with the constructs (expression vectors containing the optimized genes) by heat shock and selected for Ampicillin resistance. The expression of recombinant proteins was induced with 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), for 4 h at 30°C. The bacteria were lysed by ultrasonication (6 pulses of 30 sec and extent 50), centrifuged at 10,000 rpm/10 min/4°C and the supernatant containing the total protein extract was purified through affinity chromatography using Nickel resin (Qiagen®). Proteins were eluted with Buffer B (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 0.5M Imidazol pH 8.0) under agitation at 4°C. The purified protein were filtered with Microcon 30 (Millipore®), resuspended in PBS and quantified by optical density using the Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Kodak®). The production of specific polyclonal antibodies against *TcPGP* and *LaMDR1* was performed using the facilities of the *Bioterio Central* at CPqAM/FIOCRUZ. For the first immunization 150 μg Pgp was fractionated in 12.5% polyacrylamide gel, and the specific band was excised after electrophoretic migration. The proteic fragment was macerated in 1.2 mL PBS 1X (0.15M phosphate buffer pH 7.2) and 300 μL of Freund's complete adjuvant (Sigma®). The macerate was injected subcutaneously in rabbits. The

following three immunizations were performed after 15, 30 e 45 days, respectively, after the first one, but these times, using Freund's incomplete adjuvant (Sigma®). One week after the last immunization the animals were euthanized and the blood collected. The procedures were approved by the *Comitê de Ética para Uso de Animais* (CEUA) at Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

For the indirect immunofluorescence analysis, parental and drug resistant *T. cruzi* (M15 and B15) and *L. amazonensis* promastigotes (La10) at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL were stained with 20 nM MitoTracker/30 min prior to parasite fixation, for mitochondrion staining. The parasite suspension was fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C on cover slips containing poly-L-lysine and dried for 30min/37°C. After blocking of unspecific sites with the solution 1% PBS/BSA (bovine serum albumin) for 1 h at room temperature, slides were incubated overnight/4°C with the anti-*T. cruzi* Pgp or anti-*L. amazonensis* Pgp serum diluted 1:50 in PBS/BSA1%. Slides were then washed three times in PBS prior to incubation with fluorescein-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) diluted 1:1000 in PBS/BSA 1% for 1 h at room temperature. DNA staining was done using DAPI 1:1000 in PBS/5min. Control experiments were performed without the primary antiserum. Slides were then prepared with mounting medium (FluorPreserve™ Reagent, Calbiochem) and examined under a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan2 microscope) equipped with AxioCamMRm digital camera).

In *T. cruzi*, we did not observe a great difference in the green fluorescence signal by using either the anti-*L. amazonensis* or anti-*T. cruzi* Pgp serum. In both cases, the images show a higher FITC-derived signal in the resistant *T. cruzi* parasites M15 (Figs 2B, 2E) and B15 (Fig. 2C and 2F) compared to the parental ones (Figs 2A and 2D). However, in *L. amazonensis* the Pgp labelling was more efficient when the anti-*L. amazonensis* Pgp serum was used. In this case, we observe a stronger green fluorescence in the resistant parasites LA10 than in the parental population (Figs1A-B). These findings corroborate previous studies on the drug resistant M15 and B15 *T. cruzi* populations which showed upregulation of *TcPGP1* and *TcPGP2* genes (Campos et al., 2013). Similarly, our group showed that in *L. amazonensis* promastigotes resistant to MEOTIO (LA10) the expression of *LaMDR1* and *LaMDR2* was 4.2-fold and 5.0-fold higher in comparison to the parental population, respectively (unpublished data). The quantification of Pgp expression in both drug resistant tripanosomatids will be further accessed by flow western blot and cytometry assays using the antibodies described here.



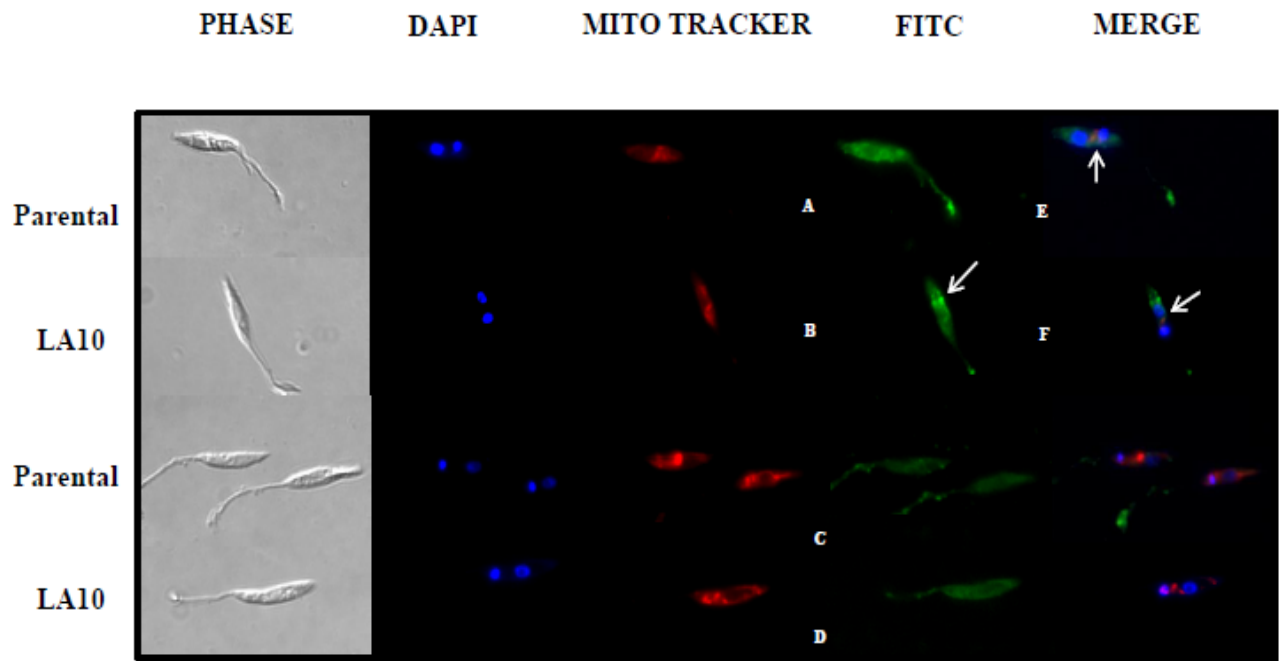


FIGURE 1

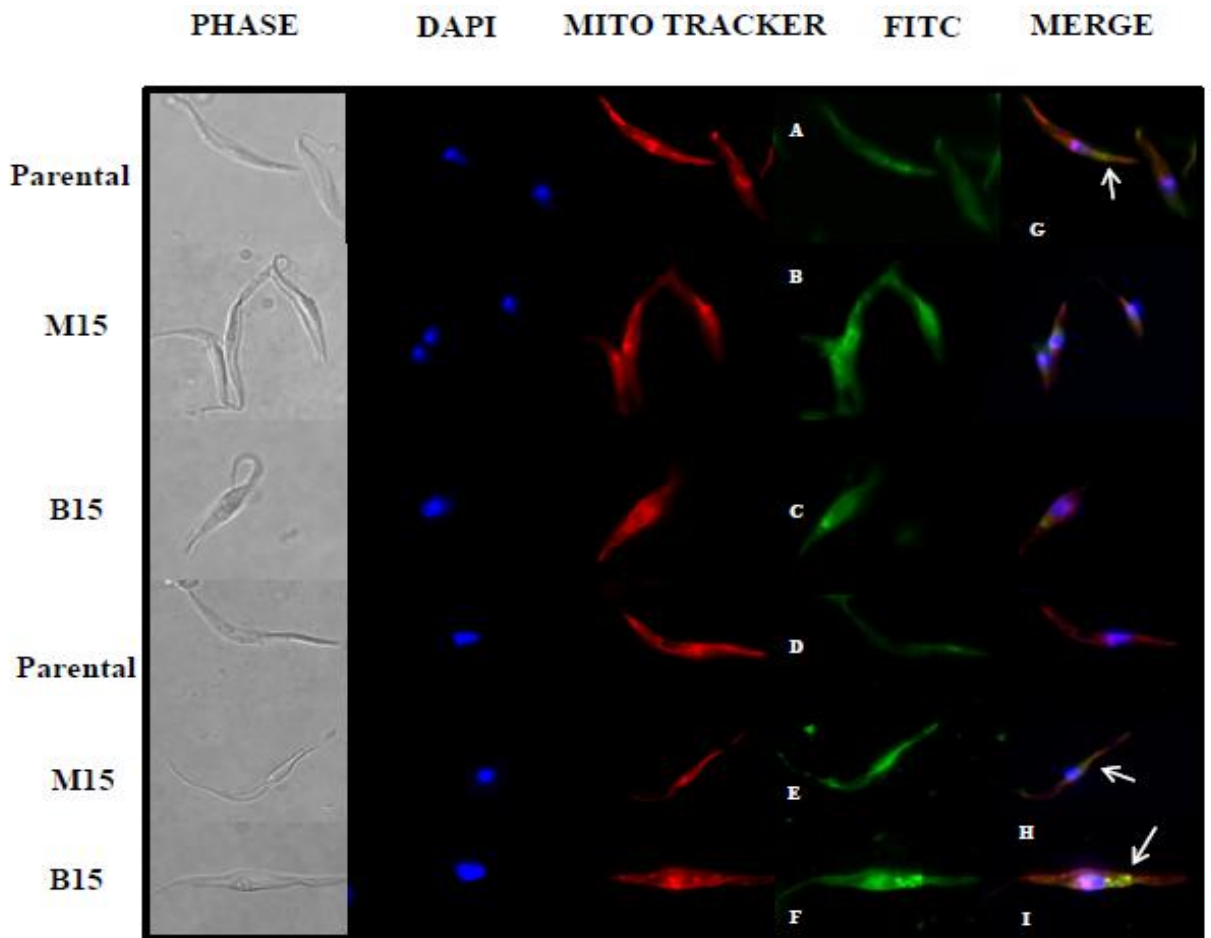


FIGURE 2

**Figures 1 and 2. Pgp localization in *L. amazonensis* (Fig.1) and *T. cruzi* (Fig.2)**

Mitochondria was labelled with Mitotracker Deep Red (red), fixed and permeabilized, reacted with anti-*L. amazonensis* Pgp serum (Figs. 1A-B and 2A-C) or anti-*T. cruzi* Pgp serum (Figs. 1C-D and 2D-F), incubated with FITC-conjugated secondary antibody (green), labelled with DAPI (blue), and viewed by indirect immunofluorescence analysis. Magnification 100x, immersion oil. Background fluorescence was very low or inexistent (not shown).

The overlap of the markers Mitotracker red and FITC green was observed (yellow), indicating that Pgp is present in the mitochondria of both *T. cruzi* and *L. amazonensis* parental and resistant parasites (Figs 1E-F, arrows; 2G-I, arrows). In *T. cruzi*, the stronger Pgp staining in the resistant parasites co-localizes with the mitochondria labelling, in accordance to some authors who have described mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in drug resistance cell lines (Munteanu et al., 2006; Solazzo et al., 2006). Thus, we can suggest that Pgp-mediated drug resistance to Benznidazole and MEOTIO in *T. cruzi* relies on Pgp localization in the mitochondria. Previous study on drug resistant *T. cruzi* populations B15 and M15 shows the Pgp-mediated efflux of rhodamine 123 in the resistant parasites (Campos et al., 2013). Altogether, our findings suggest that Pgp expression in the mitochondria may be acting pumping drugs out of the organelle, thus preventing kDNA damage. Since Benznidazole activation by type I nitroreductase occurs inside the mitochondria, by decreasing the concentration of the pro-drug Benznidazole inside this organelle, it would decrease its activation rate, resulting in the parasite survival. It is possible that a Pgp-mediated mitochondrial BZ efflux in B15 parasites may be contributing for the drug resistance mechanism in clones 1-3, obtained from B15 population (Campos et al., 2014). Studies on MDR-positive tumor cells suggest that the expression of Pgp in mitochondria may also act as anti-apoptotic agent since it blocks cytochrome c release into cytosol after apoptotic stimuli (Kojima et al., 1998).

Interestingly, in addition to the plasma membrane and mitochondria, a peculiar labelling was observed in the posterior region of *L. amazonensis*, which was stronger in the LA10 parasites (Figs 1B, arrow). It seems that Pgp is over-expressed in some organelle localised in the posterior region of resistant *L. amazonensis* promastigotes, where might be the endoplasmic reticulum or acidocalcisome. Co-localization of Pgp

with the acidocalcisome marker proton pyrophosphatase VP1 was verified in *Toxoplasma gondii* (Bottova et al., 2010). The authors suggest that Pgp may be involved in *T. gondii* Ca<sup>2+</sup> regulation. Dodge and collaborators (2004) showed the *LeMDR1* localization in secretory and endocytic compartments, such as Golgi apparatus, endoplasmic reticulum (ER) and a multivesicular tubule (MVT)-lysosome in *L. enriettii* and *L. mexicana* promastigotes. Further studies on transmission electron microscopy using immunogold labeling technique and RE and/or acidocalcisome markers would help us to clarify the exact Pgp location in the drug resistant *L. amazonensis* parasites.

Here we show for the first time the subcellular localization of *TcPGP2* in *T. cruzi*. Drug resistance to Benznidazole and MEOTIO in *T. cruzi* is associated with the expression of P-glycoprotein not only in the plasma membrane but also in the mitochondria. It is clear the over-expression of Pgp in *L. amazonensis* promastigotes resistant to MEOTIO, but apart from plasma membrane, there is another specific location for Pgp in the resistant parasites that should be further investigated. Moreover, the anti-*L. amazonensis* and anti-*T. cruzi* Pgp serum reported here may be applied in several immunological techniques on the different developmental forms of both trypanosomatids, aiming to elucidate how P-glycoprotein contributes for the drug resistant phenotype.

### **Acknowledgements**

This work was supported by funds from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (CAPES/FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FIOCRUZ.

### **References**

- Borgese N, Francolini M, Snapp E. 2006. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Curr Opin Cell Biol* 18: 358-64.
- Campos MC, Castro-Pinto DB, Ribeiro GA, Berredo-Pinho MM, Gomes LH, da Silva Bellieny MS, Goulart CM, Echevarria A, Leon LL. 2013. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitol Res* 112: 2341-51.

- Campos MC, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. 2014. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol Biochem Parasitol* 193:17-9.
- Castro JA, Mecca MM, Bartel LC. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25:471–9.
- De Oliveira ALL, Brustoloni YM, Fernandes TD, Dorval MEC, Da Cunha RV, Bóia MN. 2009. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Tropical Doctor* 39:180-2.
- DnDi, 2014 (<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>) and (<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html>).
- Filardi LS, Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:755-99.
- Gueiros-Filho FJ, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG 1995. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* *mdr1* gene. *Exp Parasitol* 81:480-90.
- Higgins CF. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism an overview. *Res Microbiol* 152:205-10.
- Haldar A K, Sen P, Roy S. 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: Current status and future directions. *Mol Biol Int* 2011: 571242.
- Kojima H, Endo K, Moriyama H, et al. 1998. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* 273:16647-50.
- Munteanu E, Verdier M, Grandjean-Forestier F, Stenger C, Jayat-Vignoles C, Huet S, Robert J, Ratinaud MH 2006. Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol* 71:1162–74.
- Murta, S.M.F., Romanha, A.J., 1998. *In vivo* selection of population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116:165-71.

- Nirdé P, Larroque C, Barnabé C 1995. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. C R Acad Sci III 318:1239-44.
- Solazzo M, Fantappie O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R. 2006. P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. Exp Cell Res 312:4070-8.
- Schmid A, Sauvage V, Escotte-Binet S, Aubert D, Terryn C, Garnotel R, Villena I. 2009. Molecular characterization and expression analysis of a P-glycoprotein homologue in *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 163:54-60.
- Villarreal, D., Nirdé, P., Hide, M., Barnabé, C., Tibayrenc, M., 2005. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. Antimicrob. Agents Chemother 49: 2701–9.

## **5. CAPÍTULO 3**

O **Capítulo 3** corresponde ao artigo publicado no *Molecular Biochemical Parasitology* no qual o objetivo principal foi verificar o papel da NTR nitroredutase tipo I (TcNTR) no mecanismo de resistência a BZ em três clones isolados de uma única população resistente. A NTR tipo I é uma enzima que cataliza a ativação dos compostos nitroheterocíclicos Bz e nifurtimox (Nif) dentro do parasito. Os resultados mostram que os clones 1-3 apresentaram diferentes níveis de resistência ao BZ, variando entre 9 e 26 vezes mais resistente que a população parental, além de apresentarem resistência cruzada com o nifurtimox (NFX). O sequenciamento gênico e a análise do perfil cromossômico revelaram que cada clone adquiriu uma mutação *stop codon* no gene TcNTR, e que no clone 1 houve a perda de uma cópia do cromossomo contendo o gene TcNTR. No entanto, estes eventos por si só não são capazes de explicar a extensão e diversidade da resistência ao BZ nestes clones de *T. cruzi*, sugerindo que mecanismos adicionais devem estar operando para contribuir com a enzima TcNTR no fenótipo de resistência. *T. cruzi* possui a habilidade de desenvolver resistência em eventos sequenciais e independentes mesmo dentro de uma única população, o que traz implicações importantes para o desenvolvimento de novas drogas contra este parasito.

Campos MC, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. 2014. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol Biochem Parasitol* 2014, 193(1):17-9.

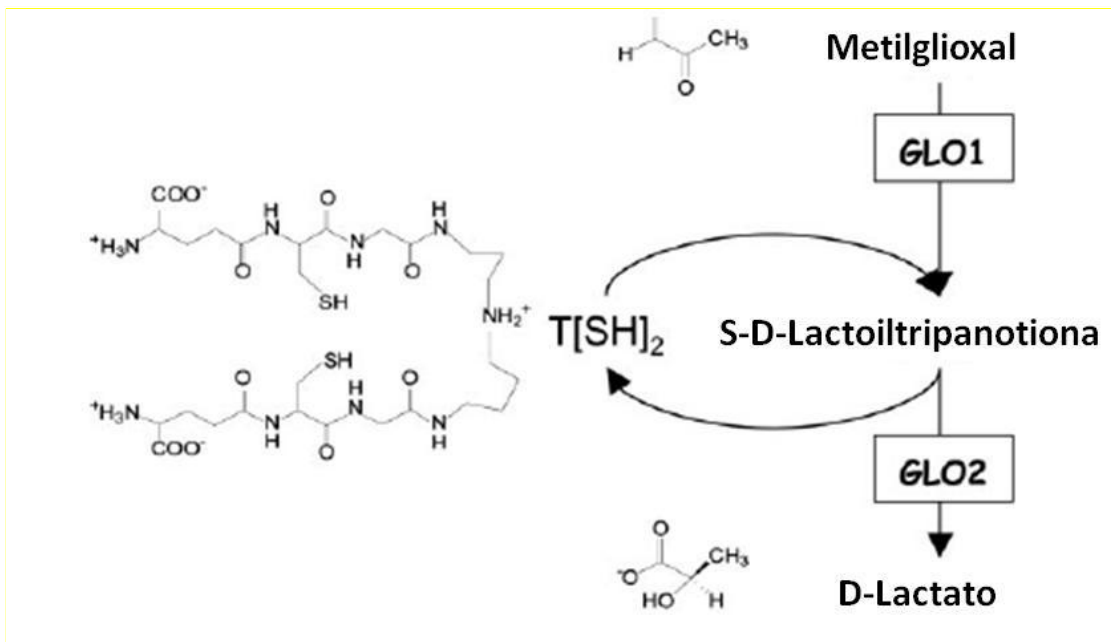
## **6. CAPÍTULO 4**



O **Capítulo 4** corresponde à análise do papel da enzima glioxalase I (TcGLO1) no mecanismo de resistência ao Bz em *T.* Após a ativação do Bz pela enzima nitrorredutase tipo I de *T. cruzi* (TcNTR), metabólitos tóxicos são formados sendo o produto final o glioxal, um dialdeído capaz de reagir com o DNA, tióis e proteínas, sendo portanto, tóxico para o parasito. Em *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos foi descrito o sistema glioxalase dependente de tióis, que conta com a participação da enzima glioxalase I, a qual atua na detoxificação do glioxal. No presente capítulo, mostramos o efeito da superexpressão do gene *TcGLO1* na suscetibilidade de *T. cruzi* ao Bz, investigando desta forma, a possível participação da enzima glioxalase I no mecanismo de resistência ao Bz neste tripanosomátido. Este estudo foi realizado no Departamento de Biologia Molecular de Patógenos da London School and Hygiene and Tropical Medicine, Londres, sob a supervisão do Dr. John Kelly.

## **Introdução**

O sistema glioxalase tiol-dependente foi descrito em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* e compreende as enzimas glioxalase I (lactoilglutaciona liase) e glioxalase II (hidroxiacilglutaciona liase) (Vickers e cols., 2004; Greig e cols., 2006; Padmanabhan e cols., 2006). Trata-se de metaloenzimas que atuam em eventos sequenciais levando à detoxificação do metilglioxal, um substrato fisiológico derivado da glicólise a partir da degradação de intermediários de triose fosfato. O metilglioxal forma espontaneamente um aduto com tióis, como a tripanotiona, dando origem ao hemitioacetal. Este, por sua vez, é isomerizado a S-D-lactoiltripanotiona, pela enzima glioxalase I. Em sequência, a glioxalase II cataliza a hidrólise do éster S-D-lactoiltripanotiona, liberando D-lactato e regenerando o tiol (Vickers e cols., 2004). Ainda, estudos mostram que embora a glutaciona também possa ser usada como substrato da glioxalase I, a constante de especificidade é maior para a tripanotiona, o que torna essa via atrativa como alvo de drogas tripanocidas (Greig e cols., 2006).



**Figura 15:** Metabolismo de metilgloxal em *T. cruzi*. A enzima glicoxalase I (GLO1) cataliza a reação de isomerização do hemitioacetal, aduto formado entre o metilgloxal e a tripanotona, a S-D-lactoiltripanotona. Em sequência, a enzima glicoxalase II (GLO2) cataliza a hidrólise do éster S-D-lactoiltripanotona, liberando D-lactato e regenerando a tripanotona (adaptado de Vickers e cols., 2004).

Levando em consideração a existência de um sistema de defesa contra o metabólito metilgloxal em *T. cruzi*, é possível que esse sistema de detoxificação também atue contra a toxicidade mediada pelo gloxal, formado a partir da redução de Bz pela enzima TcNTR. Este nitroimidazol é reduzido à hidroxilamina pela TcNTR numa reação que utiliza o NADH e a flavina FMNH<sub>2</sub> como doadores de elétrons. A hidroxilamina sofre rearranjo dando origem ao derivado hidroxilado da hidroxilamina, sob condições neutras, através de um intermediário íon nitrenium. A posterior adição de água resulta na formação de dihidro-dihidroimidazol, cuja dissociação leva à formação do metabólito tóxico dialdeído gloxal como apresentado na Figura 13 (Hall & Wilkinson, 2011).

Deste modo, seria relevante avaliar o papel da enzima glicoxalase I na suscetibilidade de *T. cruzi* a Bz e, conseqüentemente, sua possível atuação no mecanismo de resistência à droga. O racional neste caso seria que a superexpressão da enzima glicoxalase I em *T. cruzi* agiria de modo a detoxificar o hemitioacetal, formado pela ativação de Bz, o que resultaria na sobrevivência dos parasitos.

## **Objetivo**

A enzima atua na detoxificação de glioxal, um dos metabólitos tóxicos gerados após a ativação do Bz pela nitrorredutase tipo I. Este capítulo tem como objetivo a avaliação do papel da enzima glioxalase I no mecanismo de resistência ao Bz em *T. cruzi*.

## **Material e métodos**

### **Cultivo dos Parasitos**

Epimastigotas da cepa CL-Brener de *T. cruzi* foram mantidas em passagens semanais a 28°C, em meio RPMI-1640 suplementado com 0.5% (w/v) tripticase (BBL), 0.5% (w/v) HEPES, 0.03 M hemina e 10% (v/v) soro fetal bovino.

### **Obtenção de DNA e RNA de *T. cruzi***

**DNA:** Epimastigotas em fase log de proliferação (concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL) foram centrifugados a 3.000 rpm a 4°C, e o sedimento ressuspendido em 1 mL de tampão de lise (1 mM Tris-HCl pH 8,0, 0.5 mM EDTA, 10% SDS em água destilada) contendo proteinase K, incubado *overnight* a 37°C. A extração de DNA foi feita pela técnica de fenol-clorofórmio (Sambrook e cols., 1989). Ao DNA precipitado foram acrescentados 500 µL de etanol 70% por 30 min, centrifugado sob as mesmas condições anteriores, mantido a temperatura ambiente até secar completamente. O DNA foi então ressuspendido em 200 µL de água mili-Q estéril tratado com 100 µg/mL Rnase A (Thermo Scientific) por 1 hora e mantido a -20°C até o uso.

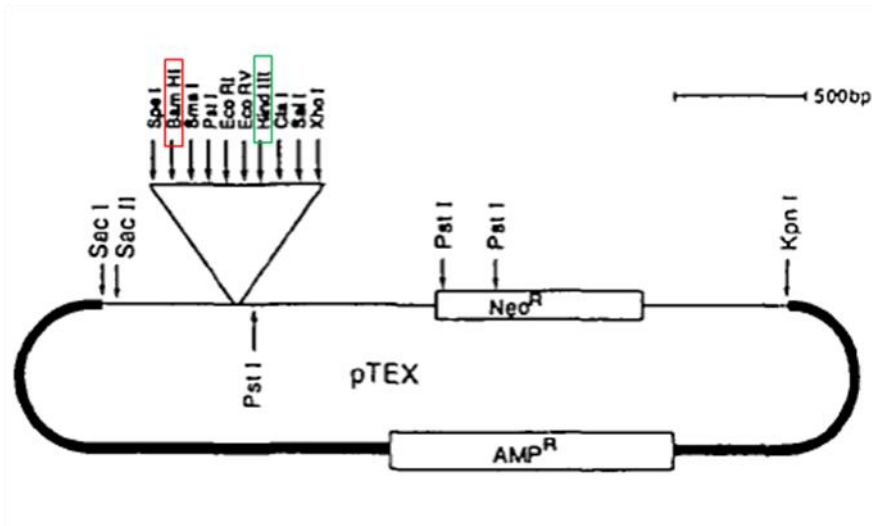
**RNA:** O RNA total foi obtido utilizando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, e tratado com DNase (Qiagen) por 15 min/temperatura ambiente.

O DNA e o RNA foram quantificados espectrofotometricamente usando NanoDrop 1000 (Thermo, Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### **Clonagem do gene *TcGLO1***

A sequência total do gene *TcGLO1* (NCBI Reference Sequence: XM\_813363.1) foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico da cepa CLBrener de *T. cruzi*. A reação de PCR foi feita utilizando enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (ThermoScientific) e *primers* contendo sítio para enzimas de restrição BamHI: Forward (5'-ATCGCGA-

GGATCC-ATGTCAACACGACGACTTATGCAC-3') e HindIII: Reverse (5'-TAGCTCT-AAGCTT-TTAAGCCGTTCCCTGTTCATTC-3'). A seguinte programação foi utilizada: 98°C por 2 min, (98 °C por 30 seg / 55 °C por 30 seg / 72 °C por 2 min) durante 30 ciclos. A avaliação do DNA amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose, e a purificação destes produtos através do *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). O produto de PCR obtido (426 bp) foi confirmado por sequenciamento pelo método de Sanger, através do analisador ABI Prism 3100, conforme descrito no capítulo 2. O produto do PCR foi então ligado ao vetor de expressão pTEX (Kelly e cols., 1992, Figura 16) usando a enzima DNA ligase (*DNA ligation kit*, Sigma Aldrich), e este plasmídeo recombinante (pTEX-TcGLO1) foi então usado para transformar bactérias *Escherichia coli*. (DH50L) Após a replicação das bactérias em placa de Petri contendo meio ágar-LB na presença de antibiótico Ampicilina, foi possível selecionar aquelas colônias contendo o plasmídeo recombinante. O plasmídeo foi isolado, utilizando o *kit* (*Qiagen Plasmid Mini Kit*, Qiagen), submetido à digestão enzimática (BamHI, HindIII) e a análise feita por eletroforese em gel de agarose para confirmar a presença do inserto de DNA naquele plasmídeo. O plasmídeo recombinante pTEX-TcGLO1 foi usado para a transfecção de epimastigotas da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.



**Figura 16:** Vetor de expressão pTEX (5.6kb). O sítio de clonagem contém 9 sítios para enzimas de restrição, incluindo as endonuclease BamHI e Hind III, usadas no presente trabalho. O vetor também contém genes de resistência aos antibióticos G418 (Neo<sup>R</sup>) e ampicilina (AMP<sup>R</sup>).

## Transfecção do pTEX-TcGLO1

Epimastigotas ( $1 \times 10^7$  parasitos/mL) em fase logarítmica de proliferação foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, o sedimento foi lavado com PBS estéril, novamente centrifugado e ressuspendido na solução de eletroporação (Amaxa cell line Nucleofactor kit V). Foram transferidos 0,2 mL desta suspensão de células para cubeta de eletroporação e em seguida foram adicionados de 40 µg de plasmídeo recombinante pTEX-TcGLO1. Em paralelo, o vetor de expressão pTEX sem o gene de interesse foi usado como controle. A eletroporação foi feita com 2 pulsos de 450 V e 500 µF, usando o aparelho Nucleofector® Device (Lonza Cologne AG, Germany). A suspensão de células foi então transferida para garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantida *overnight* a 28°C. No dia seguinte, foi acrescentado o inibidor de síntese proteica G14 (100 µg/mL). Após 3 dias os epimastigotas foram sub-cultivados, mantendo a concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL) utilizando sempre o G14 como agente seletivo, já que o plasmídeo contém gene de resistência a este antibiótico. Após 20 dias, foram selecionadas células resistentes e foi feita clonagem dos parasitos por diluição limitante.

### ***Southern blot***

O DNA obtido a partir dos parasitos transfetados foi linearizado após digestão com a endonuclease de restrição *BamH I* a 37°C por 1 h e submetido a eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão de corrida TAE 1X (Tampão Tris-acetato: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) contendo 5 µg/mL de brometo de etídeo (Merke Millipore). Após a transferência do DNA para a membrana de nylon (Hybond-N+, GE Healthcare, USA) ela foi exposta à radiação ultravioleta, permitindo a ligação covalente do DNA à membrana. A hibridização ocorreu a 65°C em solução [1% BSA (w/v), 7% SDS (w/v), 1 mM EDTA pH 8, 0.5% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] utilizando sonda específica correspondente ao gene TcGLO1(426bp) obtido por PCR. A sonda foi marcada radioativamente com [<sup>32</sup>P] dCTP usando o kit Rediprime II DNA Labeling System (GE Healthcare, Life Sciences), segundo instruções do fabricante. A análise das imagens foi feita por autoradiografia pela exposição da membrana a um filme de raio-X (Eastern Kodak Company, EUA).

### **Northern Blot**

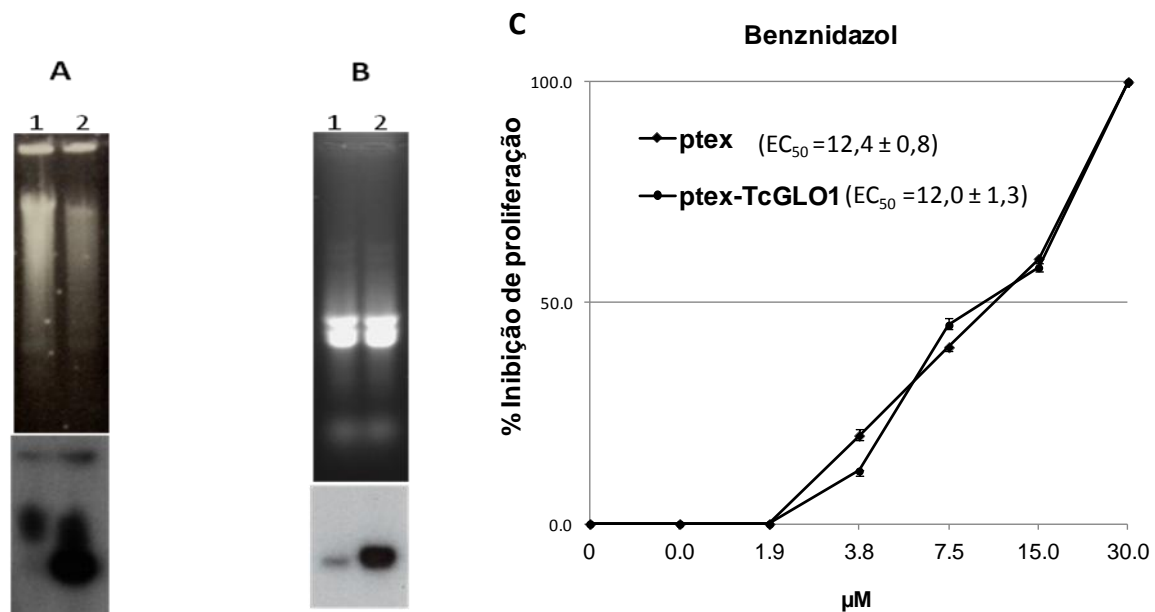
A eletroforese do RNA (10 µg) foi realizada em gel de 1% agarose-formaldeído, usando tampão de corrida (5 mM acetato de sódio, 20 mM MOPS pH 7,0, 1 mM EDTA). A transferência do RNA para uma membrana de nylon foi feita *overnight* em solução SSC 10x (1,5M NaCl, 0,15 M citrato de sódio pH 7,0). Após a transferência do RNA para a membrana de nylon, a exposição à radiação ultravioleta foi feita para ligar covalentemente o RNA à membrana. A hibridização foi feita a 42°C em solução [5 x SSC (0,75 M NaCl e 0,075 M citrato de sódio); 50 % formamida; 5 x solução Denhardt (0,5 g Ficoll 400; 0,5 g polivinilpirrolidona MW 360000; 0,5 g BSA); 1 % SDS] usando a mesma sonda descrita no item 3.5. A análise e quantificação das imagens foi feita usando o aparelho Typhoon (Amersham Biosciences) e o programa Quantity One (BioRad).

### **Atividade tripanocida**

Epimastigotas a uma concentração final de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL foram incubados em meio RPMIs contendo diferentes concentrações de Bz (1,9 a 30 µM) preparadas em dimetilsufóxido (Merck, Germany) (concentração final inferior a 1 %). Os ensaios foram realizados a 28°C por 5 dias, em placa de 48 poços, volume final de 1 mL/poço. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer e o EC<sub>50</sub> foi determinado, correspondendo à concentração que inibe 50% da proliferação dos parasitos. Parasitos não tratados foram usados como controle. Os ensaios foram realizados em duplicata, em 4 repetições.

## **Resultados e Discussão**

A presença de múltiplas cópias do gene *TcGLO1* na cepa CL-Brener de *T. cruzi* foi confirmada pela técnica de *Southern Blot* (Fig. 17A). Além disso, o ensaio de *Northern Blot* mostrou que os parasitos transfectados com o pTEX-TcGLO1 apresentaram expressão 6 vezes maior do gene TcGLO1 em relação ao controle transfectado apenas com ptex (Fig 17B). Embora a transfecção do gene TcGLO1 na cepa CL-Brener de *T. cruzi* tenha sido bem sucedida, não observamos diferença na suscetibilidade a Bz nos parasitos transfectados com o vetor ptex-TcGLO1 ou apenas ptex, sugerindo que a superexpressão da glioxalase I em *T. cruzi* não confere resistência ao Bz.



**Figura 17:** Análise por *Southern Blot* (A) *Northern Blot* (B) de epimastigotas da cepa CL-Brener transfectadas com o vetor de expressão pTEX (1) ou com o plasmídeo recombinante pTEX-TcGLO1 (2). As imagens superiores correspondem ao gel de agarose corado com brometo de etídeo e as imagens inferiores correspondem ao filme fotográfico após revelação. A sonda de DNA consiste no gene TcGLO1 marcado radioativamente com [<sup>32</sup>P] dCTP. Atividade tripanocida de Bz/5 dias sobre parasitos transfectados com pTEX ou com pTEX-TcGLO1 (C).

A enzima glioxalase 1 é uma metaloenzima que isomeriza o hemitioacetal a S-D-lactoilglutathiona, logo, requer um íon metálico como co-fator, possuindo preferência pelo níquel, mas também utiliza cobalto, manganês ou zinco (Greig, e cols., 2006). O fato de esta enzima contar com a participação de metais como co-fatores pode ser uma indicativa de que talvez fosse necessário a suplementação com estes metais nos ensaios de atividade tripanocida. Além dos metais, o tiol também é requisito para esta reação, porém os níveis de tripanotiona em epimastigotas de *T. cruzi* já são naturalmente elevados, logo, não seria necessária a adição de excesso de T[SH]<sub>2</sub> para que a reação ocorresse (Ariyanayagam & Fairlamb, 2001).

Considerando que a regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos é pós-transcricional seria interessante avaliar a expressão da enzima TcGLO1 nos parasitos transfectados, pela técnica de *Western blot*. O soro policlonal específico

anti-(*Leishmania major* GLO1) produzido por Greig e colaboradores (2006), também reconhece a TcGLO1 e poderia ser usado para este ensaio. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que esta enzima TcGLO1 esteja localizada no citosol e na mitocôndria de epimastigotas de *T. cruzi*. Assim, seria interessante avaliar a localização de TcGLO1 nos parasitos que estão super-expressando esta enzima, para confirmar se a mesma foi direcionada à mitocôndria, onde poderia estar exercendo a função de detoxificação do glioxal formado pela ativação de Bz.

A afinidade da enzima TcGLO1 pelo tiol tripanotiona reduzida em detrimento da glutatona, indica esta enzima como possível alvo para drogas tripanocidas. O efeito citotóxico de inibidores da enzima glioxalase já foi mostrado sobre microorganismos patogênicos como *Plasmodium falciparum* (Thornalley e cols., 1994) e *Staphylococcus aureus* (Edagwa e cols., 2013), e é possível que a inibição do sistema glioxalase também exerça efeito tóxico contra tripanosomatídeos. Portanto, inibidores da enzima TcGLO1 poderiam ser testados nos parasitos transfectados com ptex-TcGLO1 descritos no presente estudo, para a verificação desta hipótese.

De acordo com Hall e colaboradores (2011) a ativação do Bz leva à formação de metabólitos como a hidroxilamina e o íon nitrenium, além do produto final glioxal. Os autores sugerem que o primeiro seja capaz de reagir com ácidos nucleicos e proteínas e o segundo, possa se conjugar a tióis. De fato, parece que o glioxal sozinho não seja capaz de explicar toda a formação dos adutos de DNA detectados após a ativação da pró-droga, e que o efeito tripanocida estaria relacionado ao efeito combinatório de todos estes metabólitos.

Em suma, nossos resultados mostram que a super-expressão da enzima glioxalase I na cepa CL-Brener de *T. cruzi* não está associada à resistência ao composto Benznidazol. Tal fato sugere que um outro metabólito intermediário formado anteriormente ao glioxal, gerado após a ativação do Bz, estaria sendo responsável pela atividade tripanocida no nosso modelo de estudo.



## **7. ANEXO 1**

O **Anexo 1** corresponde à validação *in vitro* de cepas de *T. cruzi* transgênicas expressando o gene *red-shifted-luciferase* de *Photinus pyralis* (PpyRE9H). Esta variante do gene da *firefly* luciferase, comumente empregada nos ensaios de imagem por bioluminescência, foi produzida para emitir luz no comprimento de onda de 610 nm, reduzindo a absorção de luz pelo grupo heme dos eritrócitos e, portanto, permitindo a detecção dos parasitos em tecidos mais profundos. Cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes DTUs foram transfectadas com o gene PpyRE9H e a validação *in vitro* desta transfecção é descrita neste capítulo. A atividade da luciferase foi investigada em epimastigotas e tripomastigotas, bem como, os níveis de expressão da enzima em amastigotas intracelulares e sua variação célula-a-célula. Esta validação *in vitro* é fundamental para futuros ensaios de imagem por bioluminescência *in vivo*, considerado um modelo de estudo promissor para o estudo de resistência a drogas em tripanosomatídeos. Este estudo foi realizado no Departamento de Biologia Molecular de Patógenos da London School and Hygiene and Tropical Medicine, Londres, em colaboração com o Dr. Michael Lewis.

## **Introdução**

A técnica de imagem por bioluminescência trouxe avanços nos estudos de protozoários parasitos dos gêneros *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma* (Lang e cols., 2005; Myburgh e cols., 2013; Claser e cols., 2014). Trata-se de uma técnica não invasiva que está baseada na detecção de luz emitida pelos parasitos que expressam a enzima luciferase. Esta enzima cataliza a oxidação do substrato luciferina (D-LH2) a oxiluciferina na presença de ATP-Mg e oxigênio molecular, numa reação em que há liberação de energia luminosa.

O desenvolvimento de *T. cruzi* luminescente representa um grande avanço no estudo de diferentes aspectos da doença de Chagas, incluindo análise do curso da infecção *in vivo*, patogênese, tropismo tecidual e teste de novas drogas. Hyland e colaboradores (2008) descreveram o primeiro *T. cruzi* luminescente, transfectando a cepa Brazil com vetor de expressão contendo o gene *firefly* luciferase. A expressão estável desta enzima pelo parasito é requisito para o estudo de imagem por bioluminescência. Para isso, foi feita a integração do gene da luciferase em uma região essencial do genoma do parasito (*locus* tubulina) para garantir sua expressão

constitutiva. A presença do gene que confere resistência a higromicina no vetor de expressão permitiu a seleção dos parasitos após a transfecção. Os autores foram capazes de detectar luminescência nos três estágios evolutivos de *T. cruzi* pelos métodos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. Posteriormente, foram descritos trabalhos com outras cepas/clone, tais como cepa Y (Andriani e cols., 2011) e clone Dm28c (Henriques e cols., 2012; 2014).

No entanto, uma limitação deste método consiste na detecção dos parasitos em tecidos profundos. A absorção e o espalhamento dos sinais da bioluminescência são os principais problemas encontrados. A hemoglobina é um cromóforo nos tecidos e absorve luz na região azul-verde do espectro visível, o que se sobrepõe à emissão máxima da *firefly* luciferase (562 nm), a mais comum enzima usada nos estudos de bioluminescência. No intuito de melhorar a sensibilidade do método, Branchini e colaboradores (2010) descreveram a obtenção de uma variante da *firefly* luciferase, a *red-shifted* luciferase de *Photinus pyralis* (PpyRE9H), que foi produzida para emitir luz no comprimento de onda de 610 nm, reduzindo a absorção de luz pelo grupo heme dos eritrócitos e, portanto, permitindo a detecção dos parasitos em tecidos mais profundos.

McLatchie e colaboradores (2013) desenvolveram um sistema para otimizar a detecção de *T. brucei* em modelo experimental *in vivo*. O gene PpyRE9H foi integrado no genoma do parasito usando o vetor de expressão pTb-AMLuc. Quando camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com formas sanguíneas de *T. brucei* expressando PpyRE9H foi possível detectar até mesmo 100 parasitos concentrados no peritônio, com uma correlação direta entre carga parasitaria e total de bioluminescência. As imagens de bioluminescência nos animais tratados com melarsoprol, após 15 dias de infecção, revelaram a reemergência dos parasitos após o tratamento, embora a parasitemia estivesse subpatente. Para comparar a sensibilidade do *red-shifted* luciferase em relação ao gene repórter *firefly* luciferase, camundongos CD-1 foram infectados em paralelo com *T. brucei* transfectado com ambos os genes. Imagens obtidas 7 e 21 dias pós-infecção mostram claramente o aumento do sinal de bioluminescência adquirido com o *red-shifted* luciferase. Ainda, a infecção residual no cérebro de camundongos infectados com *T. brucei* 7 dias após tratamento com berenil, foi mais eficientemente detectada quando os parasitos expressando *red-shifted* luciferase foram utilizados.

Devido à sensibilidade da técnica que utiliza o gene *red-shifted* luciferase, ela pode ser explorada para o monitoramento da fase crônica da infecção murina por *T.*

*cruzi*, permitindo que a carga parasitária seja medida continuamente e a distribuição tecidual e eficácia da droga monitorada (Kelly & Taylor 2014; Lewis e cols., 2014). Assim, dois dos principais princípios quando se trata da ética no uso de animais podem ser respeitados, como o refinamento, por ser uma técnica não invasiva, e a redução, por permitir que menor número de animais seja utilizado, já que não é necessário a eutanásia dos mesmos em cada etapa da infecção e/ou tratamento.

No presente estudo foi avaliada uma variedade de cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas (Lewis e cols., 2009; Barnabé e cols., 2011) (Tabela 1). A obtenção de parasitos bioluminescentes foi feita através da integração do gene *red-shifted Photinus pyralis* luciferase (PpyRE9H) no genoma de epimastigotas de cada cepa/clone de *T. cruzi* usando o plasmídeo pTb-AMLuc. No intuito de validar a transfecção e verificar a expressão e atividade da luciferase nestes parasitos, formas epimastigotas e tripomastigotas foram avaliadas quanto aos níveis de expressão de luciferase. Em amastigotas intracelulares os níveis de expressão desta enzima e a variação célula-a-célula também foram investigados.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral**

- O presente estudo teve como objetivo a validação *in vitro* da expressão e atividade do gene repórter *red-shifted* luciferase em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade enzimática da luciferase em formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura de diferentes cepas transgênicas
- Determinar o limite de detecção de formas tripomastigotas derivadas de cultura
- Avaliar a expressão da luciferase em formas amastigotas intracelulares e analisar a variação célula-a-célula nestes parasitos

## **Materiais e métodos**

### **Células de linhagem L6 (ATCC® CRL-1458™)**

As células foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB e 4 mM L-glutamina (RPMIS), a 37 °C na

presença de 5% de CO<sub>2</sub>. O subcultivo foi realizado duas vezes por semana, para que sempre fosse mantida uma monocamada de células. Para ensaios de infecção de células com tripomastigotas, as células foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 2% SFB no intuito de restringir o crescimento celular e manter as células em monocamada.

## Parasitas

Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados utilizando-se as cepas e clones cedidos pelo Dr Michael Lewis, descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Linhagem filogenética e origens biológica e geográfica de cada cepa/clones estudados

| Cepa/Clone   | Linhagem | Origem Biológica             | Origem Geográfica         |
|--------------|----------|------------------------------|---------------------------|
| CHACO-17 AC2 | TcVI     | <i>Triatoma infestans</i>    | Chaco, Paraguai           |
| JR-AM3       | TcI      | <i>Homo sapiens</i>          | Anzoátegui, Venezuela     |
| ERA-AA1      | TcIV     | <i>Homo sapiens</i>          | Anzoátegui, Venezuela     |
| Peru-AC4     | TcVI     | <i>Triatoma infestans</i>    | Peru                      |
| CL BRENER    | TcVI     | <i>Triatoma infestans</i>    | Rio Grande do sul, Brasil |
| VFRA-ABI     | TcVI     | <i>Triatoma infestans</i>    | Francia, Chile            |
| CM17         | TcIII    | <i>Dasyprocta fugilinoso</i> | Carimaga, Colombia        |
| BUG-2148 ABO | TcV      | <i>Triatoma infestans</i>    | Rio Grande do sul, Brasil |

## Obtenção e manutenção dos parasitos

*Epimastigotas*: a manutenção de parasitos de cada cepa transfectada com o gene *red-shifted* luciferase (Tabela 1) foi feita em meio RPMI suplementado com 0.5% (w/v) tripticase (BBL), 0.5% (w/v) HEPES, 0.03 M hemina e 10% (v/v) soro fetal bovino, em passagens semanais e cultivo a 28°C.

*Tripomastigotas metacíclicas*: formas epimastigotas foram mantidas em meio RPMI por no mínimo 15 dias, sem a reposição do meio de cultura, levando à sua transformação a tripomastigotas metacíclicas devido ao estresse nutricional. A purificação de tripomastigotas metacíclicas foi feita conforme descrito por Campos e colaboradores (2013).

*Tripomastigotas de cultura de células*: Monocamadas de células de linhagem L6 em garrafas de cultura foram infectadas com 5x10<sup>6</sup> tripomastigotas metacíclicas.

Após 24 h de infecção, as garrafas foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados. A partir do 5º dia pós-infecção, tripomastigotas derivados de cultura de células começaram a ser observados no sobrenadante, sendo coletados para os ensaios de imunofluorescência.

### **Análise da atividade da enzima luciferase em epimastigotas e tripomastigotas**

*Preparação do lisado celular de epimastigotas e tripomastigotas de cultura:* O tampão de lise foi preparado conforme descrito no protocolo do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Para cada análise de atividade da luciferase,  $5 \times 10^6$  parasitos foram centrifugados por 10 minutos a 800xg, e após ser lavado com solução salina tamponada (PBS), o *pellet* final foi ressuspendido em 50  $\mu$ L do tampão de lise celular 1x CCLR (*Cell Culture Lysis Reagent*) e homogeneizado em vórtex por 10 segundos. Os tubos foram mantidos em gelo quando para uso imediato, ou preservados a -80 °C.

*Análise da atividade enzimática da luciferase:* Dez microlitros de cada amostra de parasito lisado foram adicionados a 90  $\mu$ L do substrato luciferina (Luciferase Assay System, Promega) com proteção da luz em uma microplaca de 96 poços. A leitura da reação foi feita no espectrofluorímetro (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices) a 610 nm, comprimento de onda correspondente ao pico de emissão de luminescência para a *red-shifted Photinus pyralis* luciferase (PpyRE9h). Os resultados foram expressos em unidade relativa de luz (URL) em função do número de parasitos. O limite de detecção para tripomastigotas de cultura foi avaliado por meio de diluição seriada 1:10, partindo-se de uma concentração inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos lisados, obtidos conforme descrito acima. Como controle da atividade enzimática da luciferase foram utilizadas parasitos da cepa CL-Brener transfectada com o vetor de expressão pTb-AMLuc, mas sem o gene da luciferase integrado.

### **Análise da expressão da luciferase em amastigotas intracelulares**

*Obtenção de amastigotas intracelulares:* Lamínulas de vidro esterilizadas com etanol 70% foram colocadas no fundo de placas de 24 poços. As células L6 foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500xg por 5 minutos e ressuspendidas em meio RPMI/2% SFB. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer, e foram

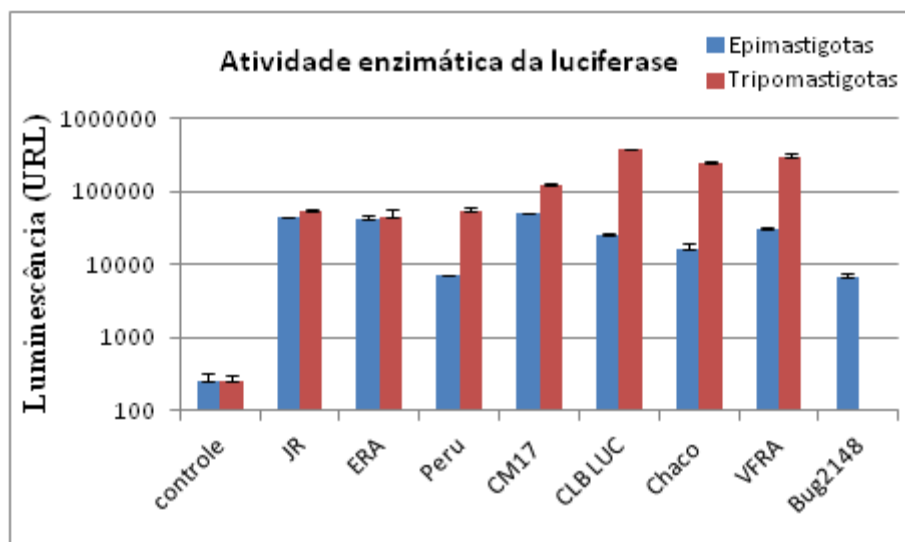
adicionadas  $1 \times 10^5$  células no volume final de 1 mL por poço. A placa foi mantida a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> por 24 h. No dia seguinte, as células foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas na proporção 5:1 (parasitos/célula) e mantidas a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> por 24 h. A reposição de meio foi feita todos os dias até o 5º dia pós-infecção, quando então as células foram preparadas para a análise da expressão da luciferase, por imunofluorescência indireta.

*Ensaio de imunofluorescência indireta:* As células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 500 µL de solução de paraformaldeído 4% (dissolvido em PBS) por 1 h em temperatura ambiente. Após remoção da solução fixadora, os parasitos foram permeabilizados com 250 µL de 0.1% Triton X-100 em PBS por 5 min. O bloqueio da ligação inespecífica foi feita com solução 20% SFB em PBS por 1 h em temperatura ambiente. A incubação com 250 µL de anticorpo primário anti-luciferase (*Polyclonal Goat anti-Luciferase antibody*, Promega) foi feita na diluição 1:500 em solução de bloqueio, overnight a 4°C em câmara úmida. As células foram lavadas em PBS por 3 vezes e incubadas com 250 µL do anticorpo secundário conjugado com Alexa488 (*Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat IgG*, Molecular Probes) na diluição 1:1000, por 1 h/temperatura ambiente. A marcação do DNA foi feita com 1 µM Hoechst 33342 (Invitrogen) por 30 min. As lamínulas foram então colocadas sobre lâminas utilizando o meio de montagem Fluorpreserve (Calbiochem). As imagens foram analisadas no microscópio confocal (Carl Zeiss, France) no aumento de 40x sob óleo de imersão.

## **Resultados e Discussão**

A Figura 17 mostra a atividade enzimática da luciferase em epimastigotas e tripomastigotas de cultura, representada em unidades relativas de luz (URL). Todas as cepas/clonemas transfectados com o gene *red-shifted* luciferase: clone CL-Brener (CL-Brener Luc), e cepas JR, ERA, Peru, CM17, Chaco, VFRA e Bug-1248 apresentaram atividade enzimática nas formas epimastigotas, embora em diferentes níveis. Tal atividade foi mantida após a transformação do parasito em tripomastigotas de cultura, o que mostra a estabilidade da expressão da enzima no decorrer do ciclo evolutivo do parasito. Em relação às cepas JR e ERA a expressão da luciferase se manteve a mesma nas formas epimastigotas e tripomastigotas, já as cepas Peru, CM17, Chaco e VFRA apresentaram maior atividade da enzima em

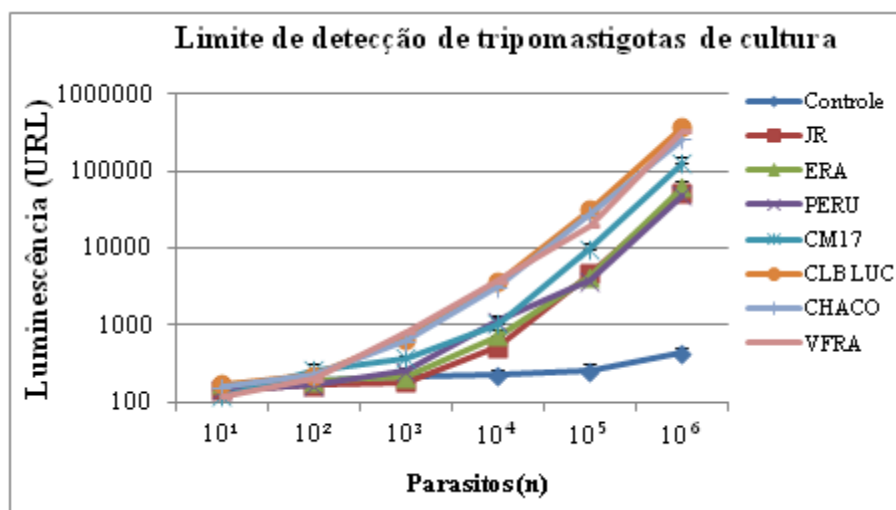
tripomastigotas de cultura. Não foi possível a obtenção de formas tripomastigotas de cultura a partir da cepa Bug-1248, devido sua baixa infectividade.



**Figura 17:** Atividade enzimática da luciferase em epimastigotas e tripomastigotas de cultura em diferentes cepas de *T. cruzi* transfectadas com o gene *red-shifted* luciferase

Os resultados da luminescência mostraram que a emissão de luz é diretamente proporcional à concentração (Figura 18). O limite de detecção para as formas tripomastigotas de cultura foi de  $10^3$  parasitos para as cepas CM17, CLB Brener Luc, Chaco e VFRA, e  $10^4$  para as cepas JR, ERA e Peru. Embora a sensibilidade do método não permita a detecção da atividade da luciferase em nível de uma única célula, ele pode ser explorado para o teste de drogas em larga escala *in vitro* e *in vivo*, de maneira eficiente conforme visto em *Leishmania* (Ashutosh e cols., 2005; Lang e cols., 2005) e *T. cruzi* (Adriani e cols., 2011).

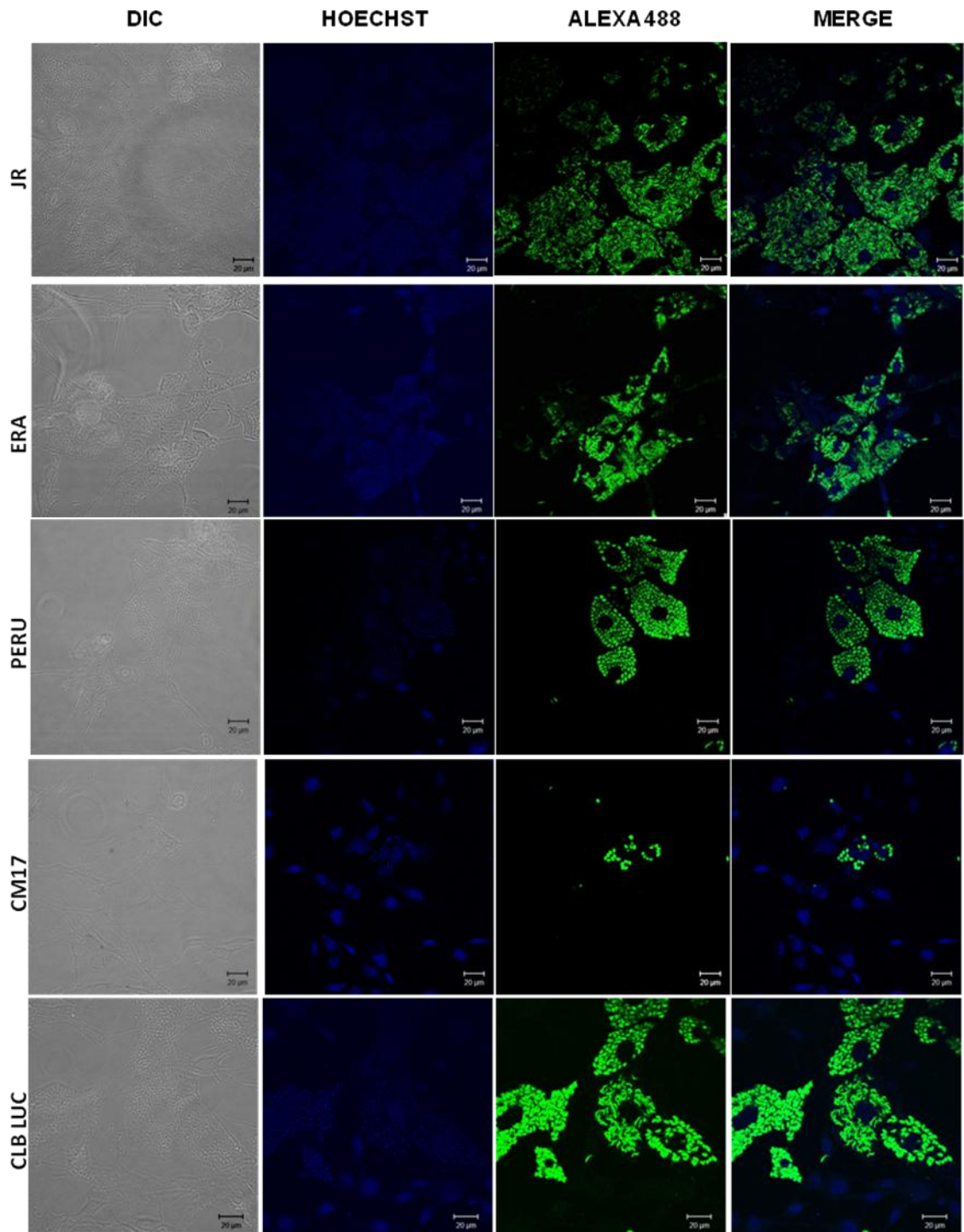


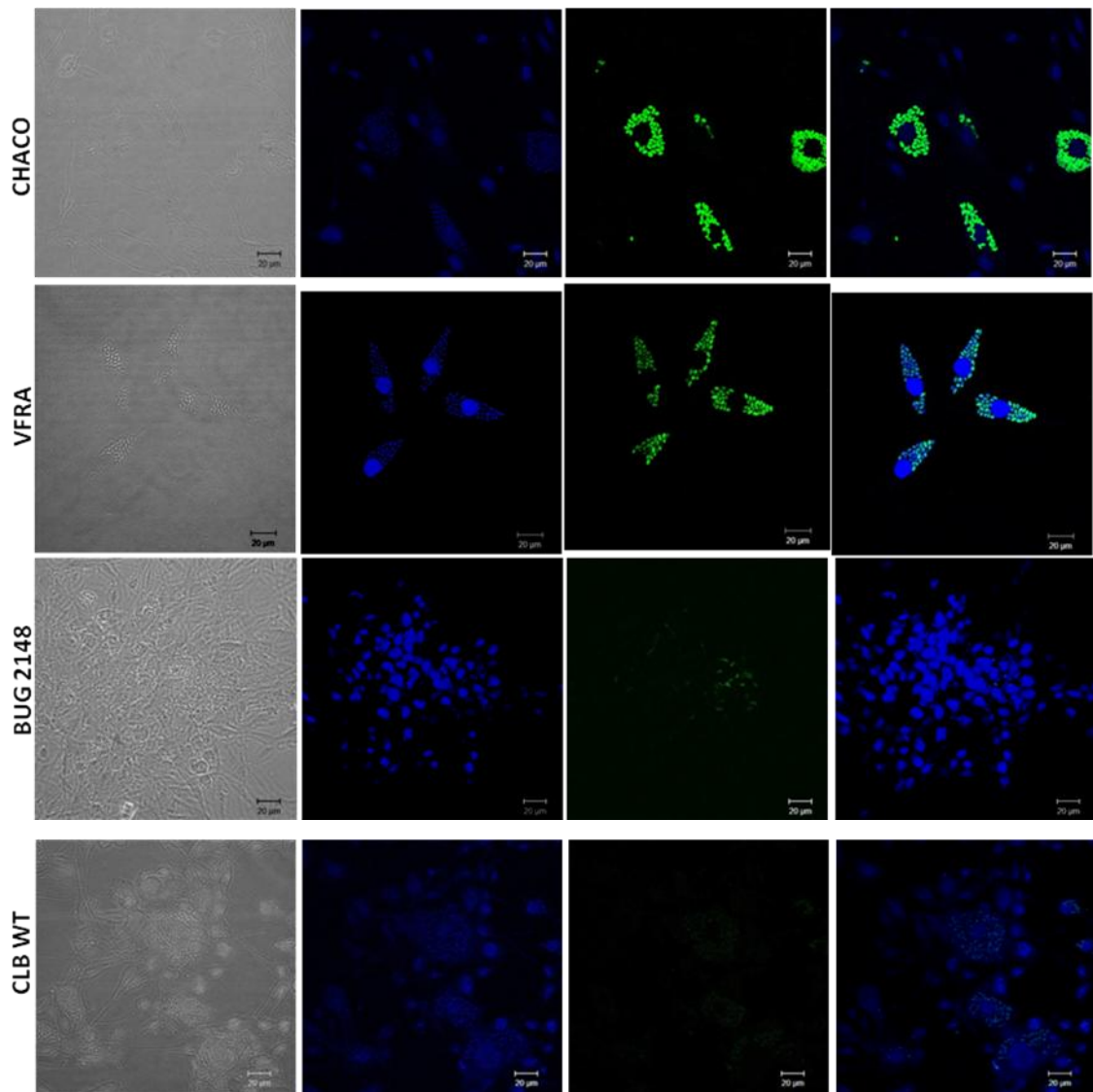


**Figura 18:** Limite de detecção da atividade enzimática da luciferase em tripomastigotas de cultura de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

As imagens de imunofluorescência mostram a expressão da luciferase em todas as cepas/clone de *T. cruzi* avaliadas: JR, ERA, Peru, CM17, CL-Brener Luc, Chaco, VFRA (Figura 19). Na infecção com o controle CL-Brener selvagem há marcação para o núcleo das células e cinetoplasto dos parasitos, mas não há fluorescência após a marcação com anticorpo anti-luciferase, conforme esperado. Quando comparamos a intensidade do sinal para a marcação com o anticorpo anti-luciferase, vemos que as cepas que apresentaram maior marcação foram CM17, CL-Brener Luc e Chaco, corroborando os resultados obtidos para as formas tripomastigotas de cultura.

Embora a cepa VFRA tenha apresentado elevada atividade enzimática para luciferase na forma tripomastigota, com limite de detecção compatível ao de CL-Brener Luc, a expressão da enzima nas formas amastigotas intracelulares apresenta-se menos intensa que o esperado. Tal fato pode ser explicado pela variação célula-a-célula observada para esta cepa, embora após a transfecção gênica dos parasitos eles tenham sido clonados por diluição limitante, no intuito de obter uma população clonal. Esta heterogeneidade na expressão da luciferase nas amastigotas intracelulares também foi observada para a cepa Peru. Em relação à cepa Bug-1248, vemos apenas pequeno número de células infectadas e poucos parasitos/célula, corroborando a dificuldade na obtenção de tripomastigotas de cultura para os ensaios de atividade enzimática.





**Figura 19:** Expressão da luciferase em amastigotas intracelulares nas diferentes cepas/clone de *T. cruzi*.

## Conclusões e Perspectivas

De acordo com sua variabilidade genética as cepas de *T. cruzi* estão classificadas em diferentes unidades discretas de tipagem (DTUs) TcI - TcVI (Zingales e cols., 2009). TcI possui ampla distribuição geográfica, elevada variabilidade, está presente em ambos os ciclos silvestre e domiciliar. TcII, TcV, e TcVI estão mais presentes em ciclos domiciliares e são menos polimórficos que TcI. TcV e TcVI são híbridos entre TcII e TcIII (Broutin e cols., 2006). TcIII e TcIV são mais prevalentes no ciclo silvestre (Miles e cols., 1981).

O presente trabalho mostra que as cepas JR-AM3 (TcI), ERA-AA1 (TcIV), CLB Luc (TcVI) e Chaco (TcVI) parecem ser as mais indicadas para futuros experimentos de bioluminescência em modelo murino, já que apresentam boa capacidade infectiva e de replicação, expressão da luciferase ao longo de todo o ciclo evolutivo e ausência de variação célula-a-célula na expressão da enzima na forma amastigota intracelular. Já a cepa CM17 (TcIII), embora tenha apresentado níveis de atividade e expressão da luciferase em tripomastigotas e amastigotas intracelulares comparáveis à da cepa de referência CL-Brener Luc, mostrou-se menos virulenta que as cepas citadas acima. Esta cepa poderia ser explorada em estudos visando à fase crônica da infecção, já que a baixa virulência do parasito pode resultar em sua persistência no hospedeiro, levando à cronicidade da doença. De fato, Marinho e colaboradores (2009) mostraram que a infecção de camundongos C3H/He com a cepa Sylvio X10/4 levou à miocardite crônica e ausência de fase aguda da doença. E, por fim, a cepa Bug-1248, por apresentar baixa infectividade e replicação, além de uma insuficiente expressão da luciferase em amastigotas intracelulares, não seria a melhor escolha para estudos de infecção em modelo murino *in vivo*. Tendo em vista a elevada diversidade biológica, bioquímica e genética intraespecífica em *T. cruzi*, é de grande importância o estudo de diferentes cepas representantes de cada DTU, no que se refere ao teste de novas drogas e estudos acerca da patogênese da doença de Chagas.

Em suma, o modelo de bioluminescência para a infecção de *T. cruzi* oferece uma gama de possibilidades para o estudo da progressão da doença a partir de diferentes cepas do parasito. Este modelo permite o acompanhamento da infecção em tempo real, de forma não invasiva, mesmo quando a parasitemia é subpatente, assim como, o acompanhamento da resolução da infecção em tecidos específicos após o tratamento, sem a necessidade de eutanasiar os animais em cada estágio do processo. Os experimentos *in vitro* aqui descritos são fundamentais para o aprimoramento e planejamento dos futuros experimentos que serão realizados *in vivo*.

## **8. DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.* são protozoários parasitos, causadores da doença de Chagas e das leishmanioses, respectivamente, que afetam milhões de pessoas no mundo (OMS, 2013). A resistência a drogas é um fator limitante para o sucesso do tratamento destas patologias e tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos (Croft e cols., 2006; Alsford e cols., 2013). A variabilidade bioquímica e molecular intraespecífica de *T. cruzi* e/ou interespecífica em *Leishmania sp.*, resulta ainda numa diversidade natural no que se refere à suscetibilidade a drogas (Teston e cols., 2013; Rai e cols., 2013). Além disso, a resistência pode ser selecionada tanto *in vitro* quanto *in vivo* quando os parasitos são cultivados na presença das drogas (Nirdé e cols., 1995; Andrade-Neto e cols., 2012). Conhecer os mecanismos envolvidos neste processo é de suma importância para o desenvolvimento de novos compostos que visem minimizar e/ou prevenir o surgimento de resistência, ou mesmo para a identificação de novos alvos quimioterápicos.

Embora os derivados de tiossemicarbazona sejam considerados promissores para tratamento de protozoários parasitos, incluindo os tripanosomatídeos, nossos resultados mostram que os derivados 4-N-(4'-hidroxi-3'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (2-MEOTIO) e 4-N-(2'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (3-MEOTIO) são capazes de induzir resistência em *T. cruzi* e *L. amazonensis*, respectivamente (Capítulos 1 e 3). O mecanismo de resistência desta classe de compostos tem sido estudado principalmente em células cancerosas, devido o seu grande potencial antitumoral (Vandresen e cols., 2014).

Rappa e colaboradores (1997) mostraram que a resistência de uma linhagem de células leucêmicas MQ-580 ao composto 3-aminopiridina-2-carboxialdeído tiossemicarbazona (3-AP) está associada ao aumento do efluxo do 3-AP nas células resistentes e à superexpressão do gene de resistência a múltiplas drogas (*MDR1*). Utilizando estas mesmas células resistentes, Cory e colaboradores (2007) verificaram o aumento do efluxo de rodamina 123 comparando com as células parentais, e que este efluxo era dependente de ATP e bloqueado pelos inibidores da Pgp verapamil e ciclosporina A. Estes resultados sugerem a participação da Pgp no efluxo de derivados de tiossemicarbazona em células tumorais. O aumento da

expressão desta glicoproteína também parece ser responsável pelo efluxo de complexos cobre-*bis*(tiossemicarbazona) em células de sarcoma uterino (Liu e cols., 2009).

Similarmente, no presente estudo vimos que a resistência à tiossemicarbazona 2-MEOTIO em epimastigotas de *T. cruzi* está associada ao aumento do efluxo de rodamina 123 e da atividade ATPásica da Pgp, bem como, à superexpressão dos genes *TcPGP1* e *TcPGP2* (Capítulo 1). Embora a maioria dos transportadores ABC descritos na literatura apresentem ambos os domínios TMD e NBD (Ambudkar e cols., 2006), a proteína TcPGP1, devido a inserção de um retrotransposon, não contém o segundo domínio NBD, no qual ocorre a hidrólise do ATP, essencial para a atividade da proteína. No entanto, é possível que TcPGP1 possa atuar como um "half transporter". Embora este tipo de transportador apresente apenas um domínio TMD e um domínio NBD, ele é capaz de realizar o efluxo de drogas e tem sido associado ao fenótipo de resistência em células tumorais (Wang e cols., 2013) e em protozoários parasitos como *Trichomonas vaginalis* (Orozco e cols., 1995) e *Leishmania major* (Manzano e cols., 2013). Vimos ainda que o composto 2-MEOTIO estimula a atividade ATPásica da Pgp, indicando que este composto seja, de fato, substrato para a proteína, tal como outro derivado de tiossemicarbazona, o Triapine® (Scarborough, 1995; Rappa e cols., 1997).

A participação de diferentes classes de transportadores ABC no efluxo de antimoniais em *Leishmania sp*, mediando o fenótipo de resistência a drogas, tem sido descrito na literatura. Transportadores ABCC, que reconhecem metais conjugados a tióis (glutathiona ou tripanotiona), foram identificados em promastigotas resistentes a antimoniais dentre eles, o gene ABCC1 que codifica para a proteína de resistência a múltiplas drogas MRPA (Callahan e cols., 1991; Papadopoulou e cols., 1994; Légaré e cols., 2001), e o gene PRP1 identificado inicialmente em promastigotas resistentes à pentamidina, e que possuem resistência cruzada com antimoniais (Coelho e cols., 2003). Ainda, resistência cruzada com miltefosina foi observada em promastigotas resistentes a daunomicina, as quais superexpressam o gene ABCB1 (*MDR1*) que codifica para a glicoproteína-P (Perez-Victoria e cols., 2001). Estudos em *L. amazonensis* mostram que o fenótipo de resistência a múltiplas drogas está associada à amplificação do gene *LaMDR1* e ao efluxo de rodamina 123 (Gueiros-filho e cols., 1995).



Dados do nosso grupo mostram que promastigotas de *L. amazonensis* resistentes à tiossemicarbazona 3-MEOTIO apresentam transcrição dos genes *LaMDR1* e *LaMDR2* 4,2 e 5,0 vezes maior, respectivamente, em relação à população parental (dados não publicados). No entanto, em tripanosomatídeos pouco se sabe a respeito do mecanismo envolvido no transporte de drogas não apenas para fora da célula, como também, para fora de organelas específicas. Desta forma, o estudo acerca da localização subcelular da Pgp em *T. cruzi* e *L. amazonensis* pode trazer contribuições importantes sobre distribuição e atividade da proteína nestes parasitos e conseqüentemente, o seu papel na resistência a drogas.

Em nossos ensaios de imunofluorescência, vimos que a resistência aos derivados 3-MEOTIO em *L. amazonensis* e 2-MEOTIO em *T. cruzi* são acompanhados de um aumento na expressão da Pgp (Capítulo 3). O interessante é que nestes parasitos a expressão da Pgp não está restrita à membrana plasmática. Em *L. amazonensis* observamos uma marcação mais evidente na região posterior do parasito resistente (LA10), quando comparado à população parental, região onde se encontram organelas como o retículo endoplasmático (RE) e o acidocalcisoma, por exemplo. A co-localização da Pgp com o marcador de acidocalcisoma, próton pirofosfatase VP1 foi verificado em *T. gondii* (Bottova e cols., 2010), e os autores sugerem que a Pgp possa estar envolvida na regulação intracelular de  $Ca^{2+}$  neste parasito. Dodge e colaboradores (2004) mostraram a localização de LeMDR1 no aparelho de Golgi, retículo endoplasmático (ER) e túbulo multivesicular (MVT)-lisosoma de promastigotas de *L. enriettii* e *L. mexicana*. Ensaios de microscopia eletrônica de transmissão usando marcadores específicos para RE e/ou acidocalcisoma, e anticorpo anti-Pgp marcado com partículas de ouro trarão informações mais precisas sobre a localização da Pgp em *L. amazonensis* (Dodge e cols., 2004)

A glicoproteína-P foi identificada na mitocôndria de *L. amazonensis* e *T. cruzi*, tanto nos parasitos resistentes quanto na população parental. A localização da Pgp na mitocôndria tem sido motivo de controvérsias na literatura. Alguns autores demonstraram a presença desta proteína em frações de mitocôndria obtidas a partir de células de mamífero (Munteanu e cols., 2006; Solazzo e cols., 2006). No entanto, segundo Peterson e colaboradores (2007) estas frações de mitocôndria estariam contaminadas com frações de membrana plasmática. Para verificar esta

hipótese, os autores avaliaram células resistentes a vimblastina (KB-V1) (Shen e cols., 1986) e células resistentes a adriamicina (MCF7) (Clarke e cols., 1992), as quais expressam altos níveis de Pgp. Eles identificaram a presença da Pgp em frações de mitocôndria, no entanto, após a purificação destas frações para remoção de possíveis contaminantes como a membrana plasmática, verificaram que na verdade a Pgp não está presente nesta organela. Essa observação foi confirmada por ensaios de microscopia confocal usando anticorpo anti-Pgp e marcador específico para a mitocôndria (Mitotracker Deep Red).

Através da técnica de imunofluorescência, utilizando parasitos íntegros, verificamos a presença da Pgp na mitocôndria de *T. cruzi*, sendo que a expressão da proteína nesta organela é maior nos parasitos resistentes a 2-MEOTIO, em relação à população parental. A expressão da Pgp na mitocôndria pode estar contribuindo com o fenótipo de resistência, através do efluxo dos compostos para fora da organela, protegendo o kDNA do parasito. O mecanismo de ação da 2-MEOTIO ainda precisa ser elucidado, mas a superexpressão da Pgp na mitocôndria dos parasitos resistentes pode ser um indicador de que a mitocôndria atue como alvo para este composto. De fato, a mitocôndria já foi apontada como alvo para tiossemicarbazonas. Por exemplo, a atividade leishmanicida do composto benzaldeído tiossemicarbazona complexado com cobre (BenzCo) está associada à disfunção mitocondrial, com despolarização da membrana e alterações na ultraestrutura desta organela, e ao estresse oxidativo dentro do parasito (Britta e cols., 2012).

Nossos resultados sugerem o envolvimento da Pgp na resistência ao BZ em *T. cruzi*, conforme observado pelo aumento da atividade ATPásica e efluxo de rodamina 123, resistência cruzada com moduladores da Pgp, e superexpressão dos genes *TcPGP1* e *TcPGP2*, características do fenótipo MDR (Ambudkar e cols., 1999). Tal como visto em relação à 2-MEOTIO, o BZ também parece ser substrato para a Pgp em *T. cruzi* (Capítulo 1). Rigalli e colaboradores (2012) observaram aumento da expressão e da atividade desta glicoproteína em células de carcinoma hepático HepG2 após tratamento com BZ. Os autores viram ainda, através de experimentos usando a técnica de interferência por RNA (RNAi), que a Pgp está envolvida no efluxo de BZ pelas células HepG2, corroborando nossos achados em *T. cruzi*.

Estudos acerca do mecanismo de resistência ao BZ em *T. cruzi* revelam uma ampla variabilidade entre diferentes cepas do parasito, cuja resistência tenha sido induzida *in vitro* ou *in vivo* (Villarreal e cols., 2004; Andrade e cols., 2008). Esta variabilidade pode explicar porque Murta e colaboradores (2001) não encontraram evidências para a participação da Pgp na resistência ao BZ em *T. cruzi*. Em estudos posteriores deste mesmo grupo (Murta e cols., 2006), foram avaliados os níveis de transcritos do gene TcOYE, que codifica para a enzima prostaglandina PGF<sub>2</sub> sintase (*old yellow enzyme*), em 17 cepas, resistentes e não resistentes ao BZ e a diminuição da transcrição deste gene foi observada em apenas uma cepa resistente, em relação a sua população parental (cepa 17LER). O gene *TcOYE* cataliza a síntese de prostaglandina, e parece ser capaz de reduzir nifurtimox em condições anaeróbicas (Kubata e cols., 2002). Até o momento, não há evidências para a existência de um mecanismo comum de resistência dentro de cada DTU de *T. cruzi*, ou entre cepas que apresentam resistência natural e selecionada em laboratório (Villarreal e cols., 2004; Dos Santos e cols., 2008).

No presente estudo, a indução da resistência ao BZ em *T. cruzi* foi estabelecida após pressão seletiva com a droga durante 15 passagens, obtendo-se um aumento de 4,7 vezes no valor EC<sub>50</sub>, com manutenção da resistência durante todo o ciclo do parasito (Capítulo 2). Ainda, a curva de proliferação dos clones 1-3 mostra que os parasitos apresentaram maior tempo de geração que a população parental, corroborando os achados de Nirdé e colaboradores (1995). A estabilidade do fenótipo resistente em epimastigotas da população B15 cultivada por 6 meses na ausência de BZ também foi verificada e corrobora os estudos em cepas de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* a esta droga (Villarreal e cols., 2005) e *in vivo* (Dos Santos e cols., 2008). A facilidade com que uma cepa de *T. cruzi* pode adquirir resistência ao BZ *in vitro* ou mesmo *in vivo*, pode explicar o grande número de falhas terapêuticas observado durante o tratamento da fase crônica da doença de Chagas, já que o tratamento é feito por um longo período (Castro e cols., 2006; Wilkinson e cols., 2009).

BZ e Nifurtimox são pró-drogas e ambas precisam ser ativadas dentro do parasito pela nitrorredutase tipo-I presente na mitocôndria do parasito (*TcNTR*) (Wilkinson e cols., 2008). A redução do BZ resulta na formação de do metabólito

tóxico glioxal (Hall e cols., 2012), enquanto que a redução do Nifurtimox leva a produção de cadeia nitrilas abertas insaturadas, as quais possuem propriedades tripanocidas (Hall e cols., 2011). No presente estudo, examinamos três clones de *T. cruzi* (cepa Y) derivados de uma única população resistente ao BZ (B15) que foi selecionada pela exposição a concentrações crescentes desta droga (Capítulo 2). A estrutura e a expressão do gene *TcNTR* em cada clone resistente foram analisadas. O cariótipo revelou uma variação na ploidia nos cromossomos homólogos que contêm o gene *TcNTR*, sendo verificada a deleção de uma cópia do cromossomo no clone 1. O sequenciamento do gene *TcNTR* nos clones resistentes revelou uma substituição C/T na posição 568, gerando um *stop codon* (TGA) no meio do gene, o que resultou numa proteína truncada deficiente no sítio de ligação carboxil terminal do FMN. Resultados semelhantes já foram descritos na literatura em cepas de *T. cruzi* resistentes ao BZ, tais como a perda de cópia dos cromossomos contendo o gene *TcNTR* (Wilkinson e cols., 2008; Mejia e cols., 2012) e mutações na região de ligação ao FMN de *TcNTR*, que resultam em perda da atividade da enzima (Mejia e cols., 2012). Nestes estudos também foi verificada a resistência cruzada com outros compostos nitroheterocíclicos. Em nosso trabalho, vimos que os clones 1-3 apresentaram resistência cruzada com Nifurtimox a níveis variando entre 2 a 4-vezes. Podemos inferir que o mecanismo responsável pela resistência cruzada, ou seja, a inativação da *TcNTR*, não é suficiente sozinho para explicar toda a extensão e variabilidade da resistência ao BZ, cujos níveis variaram entre 9 a 26-vezes. Além disso, embora os clones 1 e 2 sejam homozigotos para a mutação do gene *TcNTR*, eles se diferem significativamente quanto à resistência ao BZ sugerindo que um mecanismo adicional deve ter ocorrido e atuado independentemente nos casos destes clones. Estudos anteriores (Wilkinson e cols., 2008; Mejia e cols., 2012) mostraram que *TcNTR* nulos mutantes apresentam resistência ao BZ entre 6 a 10 vezes, ao passo que clone 2 e o clone 3, vimos que essa razão era de 26 e 14 vezes, respectivamente. Estes mecanismos adicionais não são conhecidos, mas está claro que não resulta na resistência cruzada com Nifurtimox.

Níveis de resistência tão elevados como esses apontam para atividade de efluxo de drogas e pode estar associado à atividade da Pgp, que atua no mecanismo de resistência ao BZ na população B15 (Capítulo 1), a partir da qual os clones 1-3 foram obtidos (Capítulo 2). Os ensaios de imunofluorescência mostram a localização e maior expressão da Pgp na mitocôndria de parasitos resistentes ao BZ

(B15), local de ativação da pró-droga pela TcNTR, sugerindo que o BZ esteja sendo bombeado para fora da organela antes mesmo de ser ativado, resultando na sua sobrevivência mesmo em elevadas concentrações da droga. O aumento da expressão da Pgp na mitocôndria da população B15, também poderia estar acontecendo nos clones obtidos a partir desta população, contribuindo para os elevados níveis de resistência ao BZ, principalmente nos clones 2 e 3 (Capítulo 2).

O aumento da expressão de proteínas associadas ao metabolismo do parasito e/ou defesa antioxidante tem sido observado em alguns trabalhos sobre resistência a drogas em *T. cruzi*, no entanto, não ficou claro se esses processos consistem na causa ou na consequência do fenótipo de resistência (Portal e cols. 2008; Murta e cols. 2008; Andrade e cols., 2008; Nogueira e cols., 2009). Rojão e colaboradores (2014) analisaram a sobrevivência de cepas de *T. cruzi* expostas ao BZ usando parasitos transgênicos superexpressando diferentes proteínas de reparo de DNA. Os autores viram que o BZ cataliza a formação de quebra de dupla fita de DNA no parasito. A superexpressão de proteínas envolvidas no reparo de DNA e também kDNA aumentou a sobrevivência dos parasitos na presença do BZ, o que não descarta a possibilidade de que estas enzimas estejam atuando no mecanismo de resistência. O trabalho de Baker e colaboradores (2011), usando uma biblioteca de RNA de interferência em *T. brucei* para a identificação de genes importantes na resistência a drogas neste parasito, reforça e valida o papel da NTR na resistência ao Nifurtimox e ao BZ, indicando esta enzima como principal ativadora destas pró-drogas. Os autores não identificaram nenhum transportador para a captação da droga, sugerindo que os compostos atravessassem a membrana por difusão simples. Variações naturais na sensibilidade ao BZ têm sido identificadas em isolados Colombianos ( $EC_{50}$  4–30  $\mu$ M), mas não estão associados a mudanças na sequência do gene *TcNTR* (Mejia e cols., 2012), sugerindo que a indução da resistência nos clones não seja uma seleção de uma característica já existente, e sim, um resultado da pressão seletiva exercida pela droga.

Ao examinarmos o nível de expressão de *TcNTR* por *Northern blotting*, observamos um aumento na quantidade do gene transcrito em cada clone resistente. Uma explicação para este fato seria a tentativa de aumentar o nível de expressão da proteína, de forma de compensar a sua inatividade. O papel biológico de *TcNTR* ainda não foi demonstrado, mas evidências sugerem que ele pode

funcionar como uma NADH-ubiquinona oxidoredutase (Hall e cols., 2012; Alford e cols., 2012). Caso esta enzima tenha de fato uma função fisiológica dentro do parasito, é possível que mecanismos alternativos para compensar a perda de sua atividade nos parasitos mutantes esteja ocorrendo nos clones 1 e 2, como, por exemplo, aumento da expressão da nitrorredutase TcOYE. De fato, Mejia-Jaramilo e colaboradores (2011) investigaram a expressão gênica diferencial em *T. cruzi* em uma população resistente ao BZ, através da técnica de PCR em tempo real, e observaram a regulação negativa da expressão de *TcNTR* e a superexpressão do gene *TcOYE*. Trochine e colaboradores (2014) sintetizaram e imobilizaram um derivado do BZ usando uma matriz sólida e avaliaram as proteínas capazes de se ligar a esta molécula, por espectrometria de massas. Uma das proteínas identificadas como um ligante específico do BZ foi um membro da família aldocetorredutase, TcAKR, que, assim como as enzimas TcNTR e TcOYE, é uma oxirredutase dependente de NADPH, encorajando futuros estudos acerca da capacidade desta enzima em reduzir o BZ e/ou sua participação no mecanismo de resistência à droga.

O fato da ativação das pró-drogas nitroheterocíclicas serem catalizadas pela NTR tipo I, ausente nas células de mamífero, tem estimulado a investigação destes compostos como agentes anti-tripanosomatídeos (Hall e cols., 2010; Wilkinson e cols., 2011). Hall e colaboradores (2012) avaliaram uma série de compostos aziridinil benzoquinonas contra formas tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei*. Os autores demonstraram que diferentes quinonas são substrato para a enzima NTR do parasito, e ainda, que a atividade tripanocida destes compostos é dependente desta nitrorredutase. Voak e colaboradores (2013) demonstraram que a atividade leishmanicida de nitrobenzilfosforamida é dependente da NTR tipo I identificada em *L. major* (LmNTR), uma vez que promastigotas heterozigotas para o gene *LmNTR*(+/-) apresentaram resistência ao composto mais ativo nos parasitos homozigotos *LmNTR*(+/+). Estes resultados sugerem que esta via possa ser explorada, seja na ativação de pró-drogas, seja como alvo terapêutico através de inibidores que bloqueiem sua função endógena.

Hall e colaboradores (2011) verificaram que a ativação do BZ leva à formação de metabólitos intermediários como a hidroxilamina e íon nitrenium, além do produto final, o glioxal. No mesmo trabalho, foi visto que somente a formação do glioxal não

é capaz de explicar a quantidade de adutos de DNA detectados após a ativação da pró-droga, e que o efeito tripanocida estaria relacionado ao efeito combinatório de todos estes metabólitos. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que a superexpressão da enzima glioxalase I (TcGLO1), que atua na detoxificação do glioxal, não confere resistência ao BZ em *T. cruzi* (Capítulo 4), sugerindo que um outro metabólito intermediário formado anteriormente ao glioxal, gerado após a ativação do BZ, estaria sendo responsável pela atividade tripanocida do nitroderivado. O efeito citotóxico de inibidores da enzima glioxalase já foi mostrado sobre microorganismos patogênicos como *Plasmodium falciparum* (Thornalley e cols., 1994) e *Staphylococcus aureus* (Edagwa e cols., 2013), e é possível que a inibição do sistema glioxalase também exerça efeito tóxico sobre tripanosomatídeos. A afinidade da enzima TcGLO1 pelo tiol tripanotiona reduzida em detrimento da glutathiona, indica esta enzima como possível alvo para drogas tripanocidas. Portanto, inibidores da enzima TcGLO1 poderiam ser testados nos parasitos transfectados com ptex-TcGLO1 descritos no presente estudo (Capítulo 4), para a verificação desta hipótese.

O sequenciamento gênico total da cepa Y parental e dos clones resistentes ao BZ está sendo realizado em colaboração com os pesquisadores John Kelly e Taane Clark, da London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido. O objetivo do trabalho é comparar a sequência genômica total da cepa Y parental de *T. cruzi* com as sequências dos clones resistentes ao BZ (clones 1-3), identificando possíveis polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) bem como os genes em que estas mutações estão presentes, e desta forma, obter mais informações acerca do mecanismo de resistência ao BZ nestes parasitos. Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas ao sequenciamento realizado no Sanger Institute, Cambridge, Reino Unido, e estão sob análise no presente momento.

Com base na validação *in vitro* da transfecção com o gene *red-shifted* luciferase em *T. cruzi* (Anexo 1), as cepas JR-AM3 (TcI), ERA-AA1 (TcIV), CLB Luc (Tc VI) e Chaco (TcVI) parecem ser as mais indicadas para futuros experimentos de bioluminescência *in vivo*. Estas cepas apresentam boa capacidade infectiva e replicativa, expressão da luciferase ao longo de todo o ciclo evolutivo, sem variação célula-a-célula na forma amastigota intracelular. Tais características também foram

observadas em relação à cepa CM17 (TcIII), no entanto, por ser menos virulenta esta cepa pode ser explorada em modelo murino de infecção crônica, conforme revisto por Marinho e colaboradores (2009).

Tendo em vista a elevada diversidade biológica, bioquímica e genética intraespecífica em *T. cruzi*, é de grande importância o estudo de diferentes cepas representantes de cada DTU, no que se refere ao teste de novas drogas e estudos acerca da patogênese da doença de Chagas. Em suma, o modelo de bioluminescência para a infecção de *T. cruzi* oferece uma gama de possibilidades para o estudo da progressão da doença permitindo o acompanhamento da infecção em tempo real, de forma não invasiva, mesmo quando a parasitemia é subpatente, assim como, o acompanhamento da resolução da infecção em tecidos específicos após o tratamento, sem a necessidade de eutanásia dos animais em cada estágio do processo. Esta validação *in vitro* é fundamental para futuros ensaios de imagem por bioluminescência *in vivo*, considerado um modelo de estudo promissor para o estudo de resistência a drogas em tripanosomatídeos.

Em suma, neste trabalho verificamos que a resistência induzida por derivados de tiossemicarbonos nos tripanosomatídeos *T. cruzi* e *L. amazonensis*, e pelo BZ em *T. cruzi* conta com a participação da bomba de efluxo Pgp, cuja localização subcelular não está restrita à membrana plasmática dos parasitos. Em clones isolados partir da população resistente ao BZ, a mutação na enzima NTR tipo I é o ponto de partida para o mecanismo de resistência à droga, embora mecanismos distintos e/ou adicionais atuem em cada clone para promover a resistência. A participação da enzima glioxalase I na resistência ao BZ não foi verificada, no entanto esta via representa um interessante potencial a ser explorado como alvo terapêutico. Por fim, descrevemos a validação de um modelo de imagem por bioluminescência em diferentes cepas de *T. cruzi*, o qual pode ser aplicado para a avaliação não apenas do mecanismo de resistência, como também, para o teste de novas drogas contra este parasito. Os conhecimentos obtidos a partir deste trabalho servirão de base para futuros estudos que visem o desenvolvimento racional de novos compostos, ou de ação combinada de drogas com potencial atividade anti-tripanosomatídeos.



## **9. CONCLUSÕES**

## 9. CONCLUSÕES

- Os compostos 4-N-(2'-metoxi estiril)-tiossemicarbazona (2-MEOTIO) e BZ são capazes de induzir resistência *in vitro* em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e esta resistência é mantida durante todo o ciclo evolutivo do parasito.
- A resistência de *T. cruzi* ao composto 2-MEOTIO pode ser revertida após o cultivo do parasito por três meses em meio de cultura na ausência da droga. Já a resistência ao BZ é estável pelo menos seis de cultivo de epimastigotas na ausência do composto.
- Formas epimastigotas de *T. cruzi* resistentes ao 2-MEOTIO e BZ apresentam maior atividade de efluxo da Pgp, reversão do fenótipo resistente na presença de inibidores da Pgp, resistência cruzada com moduladores da Pgp e maior expressão dos genes *TcPGP1* and *TcPGP2* comparados à população parental, sugerindo a participação da Pgp na resistência a drogas em *T. cruzi*.
- Os clones 1-3 obtidos a partir de uma mesma população cepa Y de *T. cruzi* resistente ao BZ (B15) apresentam diferentes níveis de resistência a esta droga, e que esta resistência está associada à mutação *stop codon* no gene que codifica para a enzima nitrorredutase tipo I (*TcNTR*) e/ou à perda do cromossomo contendo o gene *TcNTR*.
- Embora a mutação e/ou perda do cromossomo contendo o gene *TcNTR*, representem um importante mecanismo de resistência ao BZ, esses processos sozinhos não são capazes de explicar toda a extensão e diversidade da resistência ao BZ entre os clones 1-3, indicando que mais de um mecanismo está sendo responsável pelo desenvolvimento da resistência à droga em *T. cruzi*, e que estes mecanismos se divergem mesmo entre clones obtidos de uma mesma população.
- A resistência ao BZ e à tiossemicarbazona 2-MEOTIO em *T. cruzi* estão associadas à expressão da Pgp na membrana plasmática e na mitocôndria de epimastigotas, sugerindo o efluxo de drogas não apenas para fora da célula através da membrana plasmática, como também, da mitocôndria para o citosol.

Em *L. amazonensis*, embora a Pgp esteja expressa tanto na membrana plasmática quanto na mitocôndria, o fenótipo de resistência parece estar relacionado a uma organela situada na região posterior do parasito, a qual será melhor investigada em trabalhos futuros.

- A superexpressão do do gene *TcGLO1* na cepa CL-Brener de *T. cruzi* não confere resistência ao BZ, sugerindo que outro(s) metabólito(s) intermediário(s) formado(s) anteriormente ao glioxal, após a ativação do BZ, estaria sendo responsável pela atividade tripanocida do Bz nesse modelo de estudo.
- Os ensaios de validação *in vitro* da transfecção de cepas de *T. cruzi* com o gene *red-shifted* luciferase mostram que as cepas JR-AM3 (TcI), ERA-AA1 (TcIV), CLB Luc (Tc VI) e Chaco (TcVI) apresentam expressão constitutiva e não-variável da luciferase na forma amastigota intracelular, além de boa capacidade infectiva e de replicação, indicando que estas cepas são promissoras para futuros experimentos de bioluminescência *in vivo*, focando o estudo de resistência a drogas em *T. cruzi*.

## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham J, Salama NN, Azab AK. The role of p-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2014 . [Epub ahead of print]
- Ambudkar SV, Kim IW, Sauna ZE. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci*. 2006; 27:392-400. Review.
- Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Fernández M, González M, Denicola A, et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem* 2004;12:4885-93.
- Alsford S, Kelly JM, Baker N, Horn D. Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. *Parasitology* 2013;140:1478-91.
- Andrade-Neto VV, Matos-Guedes HL, Gomes DC, Canto-Cavalheiro MM, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:416-9.
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benzimidazole. *J Proteome Res*. 2008 Jun;7(6):2357-67.
- Andriani G, Chessler AD, Courtemanche G, Burleigh BA, Rodriguez A. Activity *in vivo* of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1298.
- Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 2005;99:733-41.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. *Mol Biochem Parasitol*. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. 2001;115:189-98.

- Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in *in vitro* drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3776-83.
- Atcclas JD, Barcan L, Nagel C, Lattes R, Riarte A. Organ transplantation and Chagas disease. *JAMA* 2008;299:1134-5.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2034-9.
- Bagher Khadem Erfan M1, Mohebali M2, Kazemi-Rad E1, Hajjaran H1, Edrissian G1, Mamishi S3, Saffari M4, Raoofian R4, Heidari M5. Downregulation of Calcineurin Gene Is Associated with Glucantime(®) Resistance in *Leishmania infantum*. *Iran J Parasitol*. 2013;8:359-66.
- Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento ÁF, Diniz Lde F, Caldas IS, Talvani A, Trunz BB, Torreele E, Ribeiro I. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1870.
- Baker N, Alsford S, Horn D. Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Mol Biochem Parasitol* 2011;176:55-7.
- Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Shikita T, Zini N, Ognibene A, Santi S, Ferracini R, Maraldi NM. Nuclear immunolocalization of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines showing similar mechanisms of doxorubicin distribution. *Eur J Cell Biol*. 1995;68:226-39.
- Barnabé C, De Meeûs T, Noireau F, Bosseno MF, Monje EM, Renaud F, Brenière SF. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs): microsatellite loci and population genetics of DTUs TcV and TcI in Bolivia and Peru. *Infect Genet Evol* 2011;1:1752-60.
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 2000;120:513-26.
- Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, Silva de Jesus R, Freire MS, de Araújo EG., Prazeres J, Grassi MFR. Clinical outcomes of thirteen patients with acute

Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Neglect Trop Dis* 2010;4:e711

Beraldo H, Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini-Rev Med Chem* 2004;4:31.

Berman JD. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clin Infect Dis* 1997;24:684-703.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24:655–81.

Bernstein RE. 1984 Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *J R Soc Med* 1984;77:608-9.

Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev Inst Trop São Paulo* 1992;34:403-8.

Bittencourt AL. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: MacLeod, org. *Parasitic infections in pregnancy and the newborn*. Oxford: Oxford Med Pub, 1988, p. 62-86.

Bot C, Hall BS, Bashir N, Taylor MC, Helsby NA, Wilkinson SR. 2010. Trypanocidal activity of aziridinyl nitrobenzamide prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4246–52. Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486:128-44. Review.

Bottova I1, Sauder U, Olivieri V, Hehl AB, Sonda S. The P-glycoprotein inhibitor GF120918 modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent processes and lipid metabolism in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*. 2010 ;5:e10062.

Branchini BR, Ablamsky DM, Davis AL, Southworth TL, Butler B, Fan F, Jathoul AP, Pule MA. Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal Biochem* 2010;396:290-7.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347-82.

Brener Z, Cançado JR, Galvão LM, da Luz ZM, Filardi Lde S, Pereira ME, Santos LM, Cançado CB. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;88:149-53.

- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111:95-105.
- Britta EA, Silva AP, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Silva CC, Sernaglia RL, Nakamura CV. Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 2012;7:e41440.
- Buckner FS. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv Exp Med Biol* 2008;625:61-80.
- Buckner FS, Wilson AJ, White TC, Van Voorhis WC. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:3245-50.
- Cáceres DC, Nicholls S, Corredor A, Gualdrón L, Slait E, Dib JC, Ariza K. Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena, 7 a 11 de junio de 1999 / Study of an outbreak of febrile syndrome with acute myocarditis in Guamal, Magdalena. *Biomédica (Bogotá)* 1999;19:253-9.
- Campos SV, Strabelli TM, Amato Neto V, Silva CP, Bacal F, Bocchi EA, Stolf NA. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:597-602.
- Campos FM, Liarte DB, Mortara RA, Romanha AJ, Murta SM. Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2009;111:56-63.
- Campos MC, Salomão K, Castro-Pinto DB, Leon LL, Barbosa HS, Maciel MA, de Castro SL. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2010;107:1193-204.
- Cançado JR. Terapêutica específica Em: Clínica e terapêutica da doença de Chagas Uma abordagem prática para o clínico geral, Dias & Coura (eds), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 1997 p.323-51.
- Caputto ME, Fabian LE, Benítez D, Merlino A, Ríos N, Cerecetto H, Moltrasio GY, Moglioni AG, González M, Finkielstein LM. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorg Med Chem* 2011;19:6818-26.



- Carvalho AS, Salomao K, Castro SL, Conde TR, Zamith HP, Caffarena ER, Hall BS, Wilkinson SR, Boechat N. Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their in vitro and in silico interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014, no prelo.
- Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis. What do we about its chemotherapy? Braz J Pharmac Scien 2000;36:69-95.
- Casero RA Jr , Klayman DL, Childs GE, Scovill JP, Desjardins RE. Activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones against *Trypanosoma rhodesiense* in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1980;18:317-22.
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol. 2006; 25:471-9. Review.
- Castro E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. Transfus Med 2009;19:16-23.
- Ceretto H, Di Maio R, Ibaruri G, Seoane G, Denicola A, Peluffo G, Quijano C, Paulino M. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. Farmaco 1998; 53:89-94.
- Chagas C. Aspecto clínico geral da nova entidade mórbida produzida pelo *S. cruzi*. Brasil Med 1910; 21:263-5.
- Chagas C. Nova trypanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. Sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;1:159-218.
- Chagas C. Processos patogênicos da tripanosomíase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1916a;8:37-60.
- Chagas C. Tripanosomíase americana: forma aguda da moléstia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1916b;VIII(II): 37-65.
- Chiquero MJ, Pérez-Victoria JM, O'Valle F, González-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. Biochem Pharmacol 1998;55(2):131-9.

- Chow LMC, Wong AKC, Ullman B, Wirth DF. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enrietti*. *Mol. Biochem. Pharmacol* 1993;60:195-208.
- Claser C, Malleret B, Peng K, Bakocevic N, Gun SY, Russell B, Ng LG, Rénia L. Rodent *Plasmodium*-infected red blood cells: imaging their fates and interactions within their hosts. *Parasitol Int* 2014;63:187-94.
- Clarke R, Currier S, Kaplan O, Lovelace E, Boulay V, Gottesman MM, Dickson RB. Effect of Pglycoprotein expression on sensitivity to hormones in MCF-7 human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1506–12.
- Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130:83-90.
- Cory JG, Cory AH, Lorico A, Rappa G, Sartorelli AC. Altered efflux properties of mouse leukemia L1210 cells resistant to 4-methyl-5-amino-1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. *Anticancer Res*. 1997;17:3185-93
- Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009;104 (supl I):549-54.
- Coura JR, Borges-Pereira J.. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2011;106:641-5.
- Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3-24.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature* 2010;465: S6-7.
- Coura JR. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. *Bol Chil Parasitol*. 1996;51:69-75. Review. Spanish.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:111-26.
- Cupello MP, Souza CF, Buchensky C, Soares JB, Laranja GA, Coelho MG, Cricco JA, Paes MC. The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Trop*. 2011;120:211-8.

- Da Rocha DR, de Souza AM, de Souza AC, Castro HC, Rodrigues CR, Menna-Barreto RF, de Castro SL, Ferreira VF. Effect of 9-hydroxy- $\alpha$ - and 7-hydroxy- $\beta$ -pyran naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi* and structure-activity relationship studies. *Med Chem*, 2013, no prelo.
- Dallagiovanna B1, Gamarro F, Castanys S. Molecular characterization of a P-glycoprotein-related tcpgp2 gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;75:145-57.
- De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Silva SA, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996;348:1407-13.
- Dias JC. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica*. 2006;22:2020-1.
- DNDi. Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas. 2014. <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/leishmanioses.html>
- Dodd RH, Ouannes C, Robert-Gero M, Potier P. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-beta-carbolines. *J Med Chem* 1989; 32: 1272-6.
- Dodge MA1, Waller RF, Chow LM, Zaman MM, Cotton LM, McConville MJ, Wirth DF. Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol*. 2004;51:1563-75.
- Dos Santos FM, Caldas S, de Assis Cáu SB, Crepalde GP, de Lana M, Machado-Coelho GL, Veloso VM, Bahia MT. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance in vivo and its modulation by in vitro culturing and mice infection. *Exp Parasitol*. 2008;120:385-90.
- Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, McKerrow JH, Cohen FE. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J Med Chem* 2002;45:2695-707.
- Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, McKerrow JH, Cohen FE. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio

semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J Med Chem* 2002;45:2695-707.

Edagwa B, Wang Y, Narayanasamy P. Synthesis of azide derivative and discovery of glyoxalase pathway inhibitor against pathogenic bacteria. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23:6138-40.

El-Fadili AK, Zangger H, Desponds C, Gonzalez IJ, Zalila H, Schaff C, Ives A, Masina S, Mottram JC, Fasel N. Cathepsin B-like and cell death in the unicellular human pathogen *Leishmania*. *Cell Death Dis* 2010;1:e71.

Engel JC, Dvorak JA, Segura EL, Crane MS. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J Protozool* 1982; 29:555-60.

Ettari R, Bova F, Zappalà M, Grasso S, Micale N. Falcipain-2 inhibitors. *Med Res Rev* 2010;;30:136-67.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:755-9.

Fu D, Bebawy M, Kable EP, Roufogalis BD. Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: implications in multidrug resistance in cancer. *Int J Cancer* 2004;109:174-81.

Fu D, Roufogalis BD. Actin disruption inhibits endosomal traffic of P-glycoprotein-EGFP and resistance to daunorubicin accumulation. *Am J Cell Physiol* 2007;292:C1543-52.

Gaál A, Orgován G, Polgári Z, Réti A, Mihucz VG, Bősze S, Szoboszlai N, Strelcić C. Complex forming competition and *in vitro* toxicity studies on the applicability of di-2-pyridylketone-4,4,-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) as a metal chelator. *J Inorg Biochem* 2014;130:52-8.

Giles FJ, Fracasso PM, Kantarjian HM, Cortes JE, Brown RA, Verstovsek S, Alvarado Y, Thomas DA, Faderl S, Garcia-Manero G, Wright LP, Samson T, Cahill A, Lambert P, Plunkett W, Sznol M, DiPersio JF, Gandhi V. Phase I and pharmacodynamic study of Triapine, a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in patients with advanced leukemia. *Leuk Res* 2003;27:1077-83.

- Glisoni RJ, Cuestas ML, Mathet VL, Oubiña JR, Moglioni AG, Sosnik A. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci* 2012;47:596-603.
- Glinma B, Kpoviessi SD, Gbaguidi FA, Kapanda CN, Bero J, Quetin-Leclercq J, Moudachirou M, Poupaert J, Accrombessi GC, Gachomo EW, Baba-Moussa L, Kotchoni SO. Trypanocidal and cytotoxic evaluation of synthesized thiosemicarbazones as potential drug leads against sleeping sickness. *Mol Biol Rep* 2014;41:1617-22.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427.
- Gourbal B1, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem.* 2004 23;279:31010-7.
- Greenbaum DC, Mackey Z, Hansell E, Doyle P, Gut J, Caffrey CR, Lehrman J, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Chibale K. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem* 2004; 47:3212-9.
- Greig N, Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 2006;400:217-23.
- Gueiros-Filho FJ, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* *mdr1* gene. *Exp Parasitol.* 1995; 81:480-90.
- Guimarães FN, da Silva NN, Clausell DT, de Mello AL, Rapone T, Snell T, Rodrigues N. Epidemic out-break of Chaga's disease in Teutonia (Estrela-Rio Grande do Sul) probably due to gastrointestinal infection. *Hospital (Rio J).* 1968;73:1767-804.

- Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med* 2006;; 3:e162.
- Hang HC, Bertozzi CR. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc Chem Res* 2001;34:727-36.
- Hall BS, Wu X, Hu L, Wilkinson SR. Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal Nitroreductase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1193-99.
- Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem.* 2011; 286:13088-95.
- Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(1):115-23.
- Hall BS, Meredith EL, Wilkinson SR. Targeting the substrate preference of a type I nitroreductase to develop antitrypanosomal quinone-based prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5821-30.
- Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1992;12:2855–65.
- Hendrickson N, Sifri CD, Henderson DM, Allen T, Wirth DF, Ullman B. Molecular characterization of the *Ldmdr1* multidrug resistance gene from *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;60:53-64.
- Henriques C, Castro DP, Gomes LH, Garcia ES, de Souza W. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors* 2012; 5:214.
- Henriques C, Henriques-Pons A, Meuser-Batista M, Ribeiro AS, de Souza W. *In vivo* imaging of mice infected with bioluminescent *Trypanosoma cruzi* unveils novel sites of infection. *Parasit Vectors* 2014; 7:89.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis; an overview. *J Postgrad Med* 2003;49:50-4.
- Hernández LM, Ramírez A, Cucunubá Z, Zambrano P. Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander, 2008. *Rev Obs S Pub San* 2009;4:28–36.

- Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev 2001;14:659-88.
- Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol. 1992;8:67-113.
- Higuchi ML, Benvenuti LA, Martins-Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Cardiovasc Res 2003;60:96-107.
- Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM, Pecoul B. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. PLoS Negl Trop Dis 2013;7:e2300
- Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS, Hallmark CJ, Musselwhite LW, Flink BJ, Bottazzi ME. Chagas disease: The new HIV/AIDS of the Americas, PLoS Negl Trop Dis 2012;6:e1498
- Hucke O, Gelb MH, Verlinde CL, Buckner FS. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. J Med Chem 2005;48:5415-8.
- Hyland KV, Asfaw SH, Olson CL, Daniels MD, Engman DM. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. Int J Parasitol 2008;38:1391-400.
- Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102:95-7.
- Jha TK. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in treatment resistant cases of Kala-azar occurring in North Bihar, India. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983;77:167-70.
- Keenan M, Chaplin JH, Alexander PW, Abbott MJ, Best WM, Khong A, Botero A, Perez C, Cornwall S, Thompson RA, White KL, Shackelford DM, Koltun M, Chiu FC, Morizzi J, Ryan E, Campbell M, von Geldern TW, Scandale I, Chatelain E, Charman SA. Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. J Med Chem 2013;56:10158-70.
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. Nucleic Acids Res 1992;20:3963-9.

- Khan SA, Asiri AM, Al-Amry K, Malik MA. Synthesis, characterization, electrochemical studies, and *in vitro* antibacterial activity of novel thiosemicarbazone and its Cu(II), Ni(II), and Co(II) complexes. *Sci World J* 2014;;592375.
- Khanye SD, Smith GS, Lategan C, Smith PJ, Gut J, Rosenthal PJ, Chibale K. Synthesis and *in vitro* evaluation of gold(I) thiosemicarbazone complexes for antimalarial activity. *J Inorg Biochem* 2010;104:1079-83.
- Kim H, Barroso M, Samanta R, Greenberger L, Sztul E. Experimentally induced changes in the endocytic traffic of P-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells. *Am J Physiol* 1997;;273:C687–702.
- Kirchhoff LV. Chagas' disease American Trypanosomiasis. *Infect Dis North America* 1993;7:487-502.
- Köberle F. Chagas' disease and Chagas'syndrome: the pathology of American Trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968;6:63-116.
- Kraus JM, Verlinde CL, Karimi M, Lepesheva GI, Gelb MH, Buckner FS. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. *J Med Chem* 2009;52:1639-47.
- Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzumi S, Ohkubo K, Lazarus M, Maruyama T, Martin SK, Duszenko M, Urade Y. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 2002;196:1241-51.
- Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol* 2005; 7:383-92.
- Lara FA, Sant'anna C, Lemos D, Laranja GA, Coelho MG, Reis Salles I, Michel A, Oliveira PL, Cunha-E-Silva N, Salmon D, Paes MC. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;355:16-22.
- Leite AC, de Lima RS, Moreira DR, Cardoso MV, Gouveia de Brito AC, Farias Dos Santos LM, Hernandez MZ, Kiperstok AC, de Lima RS, Soares MB. Synthesis, docking, and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-



- thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem*. 2006;14:3749-57.
- Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem*. 2001; 276:26301-7.
- Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*. 2003;8:411-24. Review
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1363.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:1041-9.
- Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acid compartments. *J Exp Med* 1990;171:401-13.
- Lima AP, Reis FC, Costa TF. Cysteine peptidase inhibitors in trypanosomatid parasites. *Curr Med Chem* 2013;20:3152-73
- Liu J, Hajibeigi A, Ren G, Lin M, Siyambalapitiyage W, Liu Z, Simpson E, Parkey RW, Sun X, Oz OK. Retention of the radiotracers <sup>64</sup>Cu-ATSM and <sup>64</sup>Cu-PTSM in human and murine tumors is influenced by MDR1 protein expression. *J Nucl Med*. 2009;50:1332-9.
- Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev*; 2012a. 20:53-6.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*; 2012b. 34:753-70.

- Maki N1, Hafkemeyer P, Dey S. Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. *J Biol Chem.* 2003;278:18132-9.
- Mallari JP, Shelat A, Kosinski A, Caffrey CR, Connelly M, Zhu F, McKerrow JH, Guy RK. Discovery of trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and TbcatB. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 ; 18:2883-5.
- Manzano JI1, García-Hernández R, Castanys S, Gamarro F. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:3719-30.
- Marinho CR, Nuñez-Apaza LN, Bortoluci KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, Grisotto MG, Sardinha LR, Jorquera CE, Lira S, Lima MR, Alvarez JM. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes Infect* 2009; 11:1037-45.
- Marques J, Mendoza I, Noya B, Acquatella H, Palacios I, Marques-Mejias M. ECG manifestations of the biggest outbreak of Chagas disease due to oral infection in Latin-America. *Arq Bras Cardiol* 2013;101:249-54
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J.* 2008;156:37-43.
- Mary C, Faraut F, Deniau M, Dereure J, Aoun K, Ranque S, Piarroux R. Frequency of drug resistance gene amplification in clinical leishmania strains. *Int J Microbiol* 2010.; 2010. pii: 819060.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146:601-20.
- McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 Suppl 1:263-9

- McLatchie AP, Burrell-Saward H, Myburgh E, Lewis MD, Ward TH, Mottram JC, Croft SL, Kelly JM, Taylor MC.. Highly sensitive *in vivo* imaging of *Trypanosoma brucei* expressing "red-shifted" luciferase. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7: e2571.
- Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Palacio L, Triana-Chávez O. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. Parasit Vectors. 2011; 4:169.
- Mejia AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. J Inf Dis 2012.; 206:220–8.
- Messaritakis I, Christodoulou V, Mazeris A, Koutala E, Vlahou A, Papadogiorgaki S, Antoniou M. Drug resistance in natural isolates of *Leishmania donovani* s.l. promastigotes is dependent of Pgp170 expression. PLoS One. 2013;8:e65467.
- Miles MA, Pova MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75:667-74.
- Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Bufalo DD, Cianfriglia M, Arancia G. Detection of p-glycoprotein in the golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells Int. J. Cancer 1998; 75: 885–93.
- Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa Md *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. Trop Med Int Health 2010.; 15:1049-51.
- Morales Souza H, Wandelely DMV, Brener S, Nascimento RD, Antunes CMF, Dias JCP. Hemoterapia e doença de Chagas transfusional Bol Ofic Sanit Panam 1994; 116:406-18.
- Moreira DS, Monte Neto RL, Andrade JM, Santi AM, Reis PG, Frézard F, Murta SM. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four

- New World Leishmania spp. susceptible and resistant to antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2013;3:143-53.
- Munteanu E, Verdier M, Grandjean-Forestier F, Stenger C, Jayat-Vignoles C, Huet S, Robert J, Ratinaud MH. Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:1162-74.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* ; 366:1561-77 Review.
- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 93:203–14
- Murta SM, dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ES, Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;117:223-8.
- Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ. 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*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;146:151-62.
- Murta SM, Nogueira FB, Dos Santos PF, Campos FM, Volpe C, Liarte DB, Nirdé P, Probst CM, Krieger MA, Goldenberg S, Romanha AJ. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop.* 2008;107:59-65.
- Muthukumar VA, George S, Vaidhyalingam V. Synthesis and pharmacological evaluation of 1-(1-((substituted)methyl)-5-methyl-2-oxoindolin-3-ylidene)-4-(substituted pyridin-2-yl)thiosemicarbazide. *Biol Pharm Bull* 2008; 31:1461-4.
- Myburgh E, Coles JA, Ritchie R, Kennedy PG, McLatchie AP, Rodgers J, Taylor MC, Barrett MP, Brewer JM, Mottram JC. *In vivo* imaging of trypanosome-brain interactions and development of a rapid screening test for drugs against CNS stage trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2384.

- Nirdé P, Larroque C, Barnabé C. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C R Acad Sci III*. 1995 Dec;318(12):1239-44.
- Neal RA1, van Bueren J, McCoy NG, Iwobi M. Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83:197-8.
- Nogueira FB1, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SM. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res*. 2009;104:835-44.
- Noya BA, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010.; 201:1308-15.
- Orozco E, Perez DG, Gomez MZ, Ayala P. Multidrug resistance in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today* 1995;11:473-5.
- Ouaissi A, Ouaissi M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53:102-14. Review.
- Ouellette M, Légaré D, Papadopoulou B. Microbial multidrug-resistance ABC transporters. *Trends Microbiol*. 1994; 2:407-11.
- Padmanabhan PK, Mukherjee A, Madhubala R. Characterization of the gene encoding glyoxalase II from *Leishmania donovani*: a potential target for anti-parasite drug. *Biochem J* 2006; 393, 227–34.
- Papadopoulou MV, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Kaiser M, Chatelain E, Ioset JR. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agents. *Bioorg Med Chem* 2013; 21:6600-7

- Papadopoulou MV, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Ashworth R, Wilkinson SR, Kaiser M, Andriani G, Rodriguez A. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based compounds as potential anti-Chagasic drugs: *in vivo* studies. *Future Med Chem* 2013; 5:1763-76.
- Papadopoulou MV, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Chatelain E, Kaiser M, Wilkinson SR, McKenzie C, Ioset JR. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *J Med Chem* 2012; 55:5554-65.
- Papadopoulou MV, Trunz BB, Bloomer WD, McKenzie C, Wilkinson SR, Prasittichai C, Brun R, Kaiser M, Torreele E. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based aliphatic and aromatic amines as anti-chagasic agents. *J Med Chem* 2011;54:8214-23.
- Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim S, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR. Inhibition of TDP-43 accumulation by bis(thiosemicarbazonato)-copper complexes. *PLoS One* 2012;7:e42277.
- Paterson JK1, Gottesman MM. P-Glycoprotein is not present in mitochondrial membranes. *Exp Cell Res.* 2007;313:3100-5.
- Peláez RG, Muskus CE, Cuervo P, Marín-Villa M. Differential expression of proteins in *Leishmania (Viannia) panamensis* associated with mechanisms of resistance to meglumine antimoniate. *Biomedica* 2012;32:418-29.
- Pérez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol.* 2001; 4:159-66. Review.
- Portal P, Fernández Villamil S, Alonso GD, De Vas MG, Flawiá MM, Torres HN, Paveto C. Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* suggested role on drug resistance. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160:42-51.
- Prata A. Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am.* 1994 8:61-76.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Disease* 2001; 1:92-100.

- Rai S1, Bhaskar, Goel SK, Nath Dwivedi U, Sundar S, Goyal N. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. PLoS One. 2013 ;8:e74862..
- Rajão MA1, Furtado C, Alves CL, Passos-Silva DG, de Moura MB, Schamber-Reis BL, Kunrath-Lima M, Zuma AA, Vieira-da-Rocha JP, Garcia JB, Mendes IC, Pena SD, Macedo AM, Franco GR, de Souza-Pinto NC, de Medeiros MH, Cruz AK, Motta MC, Teixeira SM, Machado CR. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. Environ Mol Mutagen 2014; 55:309-21.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. PLoS Negl Trop Dis 2010.; 4:e899.
- Rappa G, Lorico A, Liu MC, Kruh GD, Cory AH, Cory JG, Sartorelli AC. Overexpression of the multidrug resistance genes *mdr1*, *mdr3*, and *mrp* in L1210 leukemia cells resistant to inhibitors of ribonucleotide reductase. Biochem Pharmacol. 1997;54:649-55.
- Rassi Júnior A., A. Rassi, J. M. Rezende “American trypanosomiasis (Chagas disease)”, Infectious Disease Clinics in North America 2012; 26: 275-91.
- Rassi Júnior A., A. Rassi, J.A. Marin-Neto. Chagas disease”, Lancet 2010; 375:1388-402.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte. Quim Nova. 2003; 26: 550-5.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:152-8.
- Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Amato VS, Rassi Júnior A, Luquetti AO, Rassi SG. A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. Rev Soc Bras Med Trop 2004.; 37:485-9.
- Rey L. *Parasitologia*, 2<sup>a</sup> ed. Ed. Guanabara Koogan 2001, 152-5.
- Rigalli JP1, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D, Weiss J, Mottino AD, Ruiz ML, Catania VA. Regulation of biotransformation systems and

ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1951.

Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5:727-43. Review.

Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF, Ford RC. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J.Biol.Chem* 2003; .278:8294-9

Sajid M, Robertson SA, Brinen LS, McKerrow JH. Cruzain : the path from target validation to the clinic. *Adv Exp Med Biol* 2011;712:100-15. Review.

Scarborough GA. Drug-stimulated ATPase activity of the human P-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr.* 1995;27:37-41. Review.

Sampath K, Sathiyaraj S, Jayabalakrishnan C. Evaluation of DNA-binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxic activity of mononuclear ruthenium(II) carbonyl complexes of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;115:287-96.

Schröder J, Noack S, Marhöfer RJ, Mottram JC, Coombs GH, Selzer PM. Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *PLoS One* 2013;8:e77460.

Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Da Costa FB, de Castro SL, Ferreira VF, de Lacerda MV, Lago JH, Leon LL, Lopes NP, das Neves Amorim RC, Niehues M, Ogungbe IV, Pohlit AM, Scotti MT, Setzer WN, de N C Soeiro M, Steindel M, Tempone AG. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr Med Chem.* 2012;19(14):2128-75. Review.

Schormann N, Velu SE, Murugesan S, Senkovich O, Walker K, Chenna BC, Shinkre B, Desai A, Chattopadhyay D. Synthesis and characterization of potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:4056-66.

Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 2011. 50:161-78.



- Sharom FJ. Complex interplay between the P-Glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: Its role in modulating protein function. *Front Oncol.* 2014; 4:41
- Shao J, Ma ZY, Li A, Liu YH, Xie CZ, Qiang ZY, Xu JY. Thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes as potential anticancer agents: Syntheses, crystal structure, DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *J Inorg Biochem* 2014; 136C:13-23
- Sealey-Cardona M, Cammerer S, Jones S, Ruiz-Pérez LM, Brun R, Gilbert IH, Urbina JA, González-Pacanowska D. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2123-9.
- Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1998; 59:526-29.
- Soeiro MN, Werbovetz K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology* 2013;140:929-51.
- Solazzo M, Fantappiè O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R. P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res.* 2006; 312:4070-8.
- Sonveaux N, Vigano C, Shapiro AB, Ling V, Ruyschaert JM. Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J.Biol.Chem* 1999; 274:17649–54
- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW . Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1104-7.
- Suresh V. Ambudkar, In-Wha Kim, Zuben E. Sauna. The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European journal of pharmaceutical sciences* 2006; 27: 392–400
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Arbor.

- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R.. The future of Chagas disease control. Trends in Parasitol; Rev 2006; 22:583-8.
- Shen DW, Cardarelli C, Hwang J, Cornwell M, Richert N, Ishii S, Pastan I, Gottesman MM. Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins. J Biol Chem 1986;261:7762–70.
- Shikanai-Yasuda MA<sup>1</sup>, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, Amato Neto V, Tolezano JE, Peres BA, Arruda Júnior ER. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1991;33:351-7
- Shustik C, Dalton W, Gros P. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation. Mol Aspects Med. 1995;16:1-78. Review.
- Soares RO, Echevarria A, Bellieny MS, Pinho RT, de Leo RM, Seguin WS, Machado GM, Canto-Cavalheiro MM, Leon LL. Exp Parasitol 2011.;129:381-7. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*.
- Soeiro MN, De Souza EM, Stephens CE, Boykin DW. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. Exp Opin Invest Drugs 2005; 14: 957-72.
- Soto-Mancipe J, Grogl M, Berman JD. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Clin Infect Dis 1993.;16:417-25.
- Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;60:25-32.
- Suwanarusk R, Chavchich M, Russell B, Jaidee A, Chalfein F, Barends M, Prasetyorini B, Kenangalem E, Piera KA, Lek-Uthai U, Anstey NM, Tjitra E, Nosten F, Cheng Q, Price RN. Amplification of *pvm-dr1* associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. J Infect Dis. 2008;198:1558-64.

- Szajnman SH1, Ravaschino EL, Docampo R, Rodriguez JB. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15:4685-90.
- Taylor MC, Kelly JM. Optimizing bioluminescence imaging to study protozoan parasite infections. *Trends Parasitol* 2014; 30:161-2.
- Teston AP1, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GD, Gomes ML, de Araújo SM, Bahia MT, Barbosa MG, Toledo MJ. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health* 2013.;18:85-95.
- Thornalley PJ, Strath M, Wilson RJ. Antimalarial activity *in vitro* of the glyoxalase I inhibitor diester, S-p-bromobenzylglutathione diethyl ester. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:418-20.
- Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 1998.;28:85-104.
- Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrice MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:201-9.
- Trochine A, Alvarez G, Corre S, Faral-Tello P, Durán R, Batthyany CI, Cerecetto H, González M, Robello C. *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benznidazole. *Exp Parasitol*. 2014;140:33-8.
- Trondl R, Flocke LS, Kowol CR, Heffeter P, Jungwirth U, Mair GE, Steinborn R, Enyedy ÉA, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK. Triapine and a more potent dimethyl derivative induce endoplasmic reticulum stress in cancer cells. *Mol Pharmacol* 2014; 85:451-9.
- Turk, D.; Hall, M. D.; Chu, B. F.; Ludwig, J. A.; Fales, H. M.; Gottesman, M. M.; Szakacs, G. 2009. Identification of MDR1-inverse agents that selectively kill multidrug resistant cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69:8293-301
- Urbina JA, Concepcion JL, Rangel S, Visbal G, Lira R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:35-45.

- Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 Suppl 1:311-8.
- Vandresen F, Falzirolli H, Almeida Batista SA, da Silva-Giardini AP, de Oliveira DN, Catharino RR, Ruiz AL, de Carvalho JE, Foglio MA, da Silva CC. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their antitumor activity against human tumor cell lines. *Eur J Med Chem* 2014;79:110-6.
- Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH. A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13186-91.
- Villarreal, D., C. Barnabé, D. Sereno, and M. Tibayrenc. Lack of correlation between in vitro susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp. Parasitol* 2004;108:24–31.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, Armenti A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7:157-63.
- Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from bolivian patients. *Acta Trop* 2006; 100:252-5.
- Voak AA1, Gobalakrishnapillai V, Seifert K, Balczo E, Hu L, Hall BS, Wilkinson SR. An essential type I nitroreductase from *Leishmania major* can be used to activate leishmanicidal prodrugs. *J Biol Chem* 2013; 288:28466-76.
- Walcourt A, Kurantsin-Mills J, Kwagyan J, Adenuga BB, Kalinowski DS, Lovejoy DB, Lane DJ, Richardson DR. Anti-plasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool. *J Inorg Biochem* 2013;129:43-51.
- Wang M1, Wang X1, Yuan J2, Guo L1. Expression of the breast cancer resistance protein and 5-fluorouracil resistance in clinical breast cancer tissue specimens. *Mol Clin Oncol*. 2013.;1:853-57.
- Wilkinson SR, Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 29:11:e31. Review.

- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:5022-7.
- Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 2072–84.
- Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;57:151-60.
- Wong IL, Chow LM. The role of *Leishmania enriettii* multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;150:278-87.
- World Health Organization WHO 2013 [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/)
- Wyllie S, Fairlamb AH. Methylglyoxal metabolism in trypanosomes and *Leishmania*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2011; 22: 271–77.
- Yasinzai M, Khan M, Nadhman A, Shahnaz G. Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives. *Future Medicinal Chemistry* 2013; 5:1877-88.
- Zeino M, Saeed ME, Kadioglu O, Efferth T. 2014. The ability of molecular docking to unravel the controversy and challenges related to P-glycoprotein-a well-known, yet poorly understood drug transporter. *Invest New Drugs*. [Epub ahead of print]
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. . Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 2009; 1051-4.
- Zhu L, Zhou B, Chen X, Jiang H, Shao J, Yen Y.. Inhibitory mechanisms of heterocyclic carboxaldehyde thiosemicabazones for two forms of human ribonucleotide reductase. *Biochemical Pharmacology* 2009;78:1178–85.

Zuma AA, Cavalcanti DP, Maia MC, de Souza W, Motta MC. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:449-56.