

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

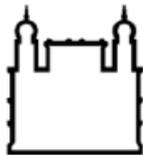
Doutorado em Biociências e Biotecnologia

**EFEITO *IN VITRO* DE DIAMINAS, AZLACTONAS E OUTROS
DERIVADOS QUÍMICOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI***

CAMILA MARIA OLIVEIRA DE AZEREDO

Curitiba

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

CAMILA MARIA OLIVEIRA DE AZEREDO

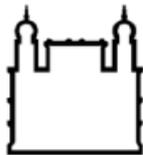
EFEITO *IN VITRO* DE DIAMINAS, AZLACTONAS E OUTROS DERIVADOS
QUÍMICOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tese apresentada ao Instituto Carlos Chagas como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Maurilio José Soares

CURITIBA

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

A993 Azeredo, Camila Maria Oliveira de

Efeito *in vitro* de diaminas, azlactonas e outros derivados químicos sobre *Trypanosoma cruzi* / Camila Maria Oliveira de Azeredo. – Curitiba, 2017.

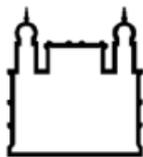
xv, 150 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2017.

Bibliografia: f. 126-144

1. Azlactonas. 2. Diaminas. 3. Derivados sintéticos. 4. *Trypanosoma cruzi*. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Doutor em
Biociências e Biotecnologia.

Aos 22 dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, às 09 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Sheila Cristina Nardelli, Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira e Dra. Marcia Kiyoe Shimada, com a finalidade de julgar a tese da candidata **Camila Maria Oliveira de Azeredo**, intitulada: "**Efeito in vitro de diaminas, azlactonas e outros derivados químicos sobre *Trypanosoma cruzi***", sob a orientação de Maurílio José Soares para obtenção do grau de **Doutor** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Sheila Cristina Nardelli**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2017

Sheila Nardelli

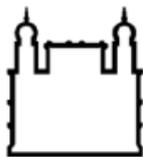
Profª. Dra. Sheila Cristina Nardelli - ICC/Fiocruz-Pr

Alda Maria Teixeira Ferreira
Profª. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira - UFMS

Marcia Kiyoe Shimada
Profª. Dra. Marcia Kiyoe Shimada- UFPR

Candidato(a): **Camila Maria Oliveira de Azeredo**

Camila Mª O. de Azeredo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurílio José Soares pela orientação, confiança e principalmente pela paciência.

Aos amigos de laboratório Claudia Maria do Nascimento Moreira, Cassiano M. Batista, Josiane Cardoso, Yohana C. Frederico, Ligia F. Ceole, Beatriz S. Borges, Rafael Kessler, Mônica Alcantara, Adriana Umaki, Luz Helena Villamizar e Priscila Hirawia pela amizade, por todas as discussões científicas, por me ajudarem nos momentos de incerteza e me acalmar quando tudo parecia dar errado! Mas principalmente, por todas as risadas e momentos descontraídos que tivemos.

As amigas Vanessa Martins dos Santos e Patricia Morking pela amizade, incentivo, ajuda com experimentos, discussão de resultados ou da falta deles!

A Priscila Hirawia e a todos os integrantes da Plataforma de Citometria de Fluxo do ICC pelos ensinamentos e suporte na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

A Aline Castro, ao Michel Batista e a Plataforma de Espectometria de Massas do ICC pela análise proteômica e todo o auxílio na preparação das amostras e nas análises.

A Plataforma de Microscopia do ICC pelo preparo e observação de amostras nos microscópios eletrônicos.

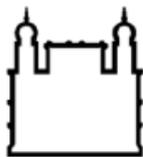
Aos colegas Nilson Fidêncio, Vanessa, Silvio, Sibelli e a todos os amigos do Instituto Carlos Chagas, pelo suporte técnico e orientação.

À Janete Azeredo, Fernando Azeredo, Beatriz Azeredo e todos da minha família que me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim em todos os segundos da minha jornada. Obrigada por não me deixar desistir e por perdoarem todas as horas em que precisei me ausentar!

Aos amigos que não estavam presentes no laboratório ou nas aulas, mas ainda assim presentes em todos os momentos... Obrigada por me escutarem reclamar, me alegrar, “pensar alto”, etc., mesmo sem entender direito o meu trabalho. Obrigada por compreenderem quando não pude estar presente e por sempre me incentivar a continuar.

Ao meu namorado, André. Amor, muito obrigada por toda a paciência que você teve comigo, principalmente nos últimos meses deste projeto. Cada colo, cada frase de conforto e cada frase de incentivo foram essenciais para que eu conseguisse concretizar este trabalho. Muito obrigada!

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

EFEITO *IN VITRO* DE DIAMINAS, AZLACTONAS E OUTROS DERIVADOS

QUÍMICOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

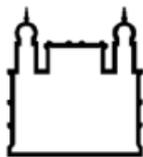
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Camila Maria Oliveira de Azeredo

Nesta tese foram avaliados 81 novos compostos sintéticos contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c pelo método MTT, sendo 4 mais eficazes em epimastigotas: GSC-01 (Índice de Seletividade IS=17,86), GIB-24 (IS=16,4), CGE (IS=8,39) e EPA-35 (IS=6,74). O composto EPA-35 foi o mais ativo contra formas amastigotas intracelulares (IS=95,04). A azlactona EPA-35 e a diamina GIB-24 foram utilizados em estudos adicionais. Com EPA-35 observou-se por citometria que a membrana plasmática de epimastigotas tratados (15 a 50 μ M) manteve-se inalterada, ocorrendo, porém, alteração no potencial de membrana mitocondrial. Redução de tamanho e arredondamento foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após tratamento de epimastigotas com EPA-35 a 33 ou 50 μ M. Amastigotas intracelulares tratados mostraram citoplasma mais eletrondensos por microscopia eletrônica de transmissão (MET), com perda da estrutura celular normal. No tratamento com GIB-24 observou-se que o tratamento de células Vero infectadas não impediu que amastigotas intracelulares completassem o ciclo intracelular, havendo porém diminuição no número de parasitas liberados com aumento na razão %amastigotas/%tripomastigotas. Significativa dissipação do potencial de membrana mitocondrial ocorreu com 6 horas de tratamento, previamente à permeabilização da membrana plasmática. Epimastigotas arredondados, com redução do tamanho celular e vacuolização do citoplasma foram observados por MEV e MET. As alterações induzidas por GIB-24 sugerem processo de morte incidental. Houve parada no ciclo celular de epimastigotas após 3 horas de tratamento (6 e 12 μ M), ficando a maioria dos epimastigotas na fase G1. Análise proteômica inicial de epimastigotas resistentes a 15 μ M GIB-24 indicou que o composto age principalmente sobre componentes mitocondriais envolvidos no ciclo de Krebs e na manutenção da homeostase oxidativa dos parasitas. Nossos dados sugerem que EPA-35 e GIB-24 são ativos contra *T. cruzi* merecendo avaliações posteriores.

Palavras-chave: Azlactonas, Diaminas, Derivados sintéticos, *Trypanosoma cruzi*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

EFEITO *IN VITRO* DE DIAMINAS, AZLACTONAS E OUTROS DERIVADOS

QUÍMICOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

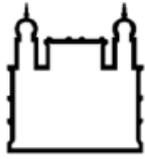
ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Camila Maria Oliveira de Azeredo

In this thesis, 81 new synthetic compounds were tested against epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* Dm28c by the MTT method, with 4 being more effective in epimastigotes: GSC-01 (IS = 17.86), GIB-24 (IS = 16.4), CGE (IS = 8.39) and EPA-35 (IS = 6.74). EPA-35 was the most active against intracellular amastigote forms (SI = 95.04). EPA-35 azlactone and the diamine GIB-24 were further evaluated. With EPA-35, it was observed by cytometry that the plasma membrane of treated epimastigotes (15 to 50 μ M) remained unchanged, but there was alteration in mitochondrial membrane potential. Reduction in size and rounding of epimastigotes were observed by scanning electron microscopy (SEM) after treatment with EPA-35 at 33 or 50 μ M. Treated intracellular amastigotes showed more electron-emitting cytoplasm by transmission electron microscopy (TEM), with loss of normal cell structure. In the treatment with GIB-24, it was observed that treatment of infected Vero cells did not prevent intracellular amastigotes completing the intracellular cycle, but there was a decrease in the number of parasites released with an increase in the % amastigotes /% trypomastigote ratio. Significant dissipation of the mitochondrial membrane occurred with 6 hours of treatment, prior to permeabilization of the plasma membrane. Rounded epimastigotes with cell size reduction and cytoplasmic vacuolation were observed by SEM and TEM. Changes induced by GIB-24 suggest an incidental death process. The epimastigote cell cycle was stopped after 3 hours of treatment (6 and 12 μ M), with the majority of epimastigotes remaining in the G1 phase. Initial proteomic analysis of 15 μ M resistant epimastigotes GIB-24 indicated that the compound acts mainly on mitochondrial components involved in the Krebs cycle and in maintaining the oxidative homeostasis of the parasites. Our data suggest that EPA-35 and GIB-24 are active against *T. cruzi* deserving further evaluation

Key words: Azlactones, Diamines, Synthetic derivatives, *Trypanosoma cruzi*.



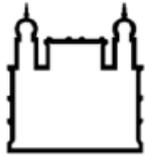
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2.1. Esquema do desenho experimental da tese.....	38
Figura 4.1. Estrutura química dos quatro derivados de azlactona avaliados nesta tese.	63
Figura 4.2. Quantificação de epimastigotas tratados com EPA-35 após 24 horas.....	64
Figura 4.3. Efeito da combinação EPA35 + Benzonidazol (BZN) contra epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	65
Figura 4.4. Efeito de EPA-35 no ciclo intracelular de amastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação durante 72h.....	66
Figura 4.5. Tratamento com EPA-35 afeta o tamanho de epimastigotas, de forma dose-dependente.....	67
Figura 4.6. Efeito de EPA-35 no potencial de membrana mitocondrial e na integridade de membrana plasmática de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	68
Figura 4.7. Ciclo de divisão celular de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento por 3 ou 24 horas com EPA-35.....	69
Figura 4.8. Exposição de fosfatidilserina e lise de epimastigotas após o tratamento com EPA-35 por 24 horas.	70
Figura 4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura de epimastigotas tratados por 24 horas com EPA-35.	71
Figura 4.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão de epimastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas.	73
Figura 4.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão de amastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas.	74
Figura 4.12. Quantificação de epimastigotas tratados com GIB-24 após 24 horas.....	78
Figura 4.13. Efeito da combinação de GIB24 + BZN contra epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	79
Figura 4.14. Tripomastigotas x GIB-24, após 4 horas de tratamento.....	80
Figura 4.15. Ciclo intracelular x GIB-24.....	81
Figura 4.16. GIB-24 x pH após 48 horas de tratamento.....	82
Figura 4.17. Tamanho de epimastigotas após 24 horas de tratamento com GIB-24;.....	83
Figura 4.18. Histogramas representativos da análise de integridade de membrana plasmática de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas.....	84

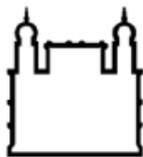


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Figura 4.19. Quantificação de população na análise de integridade de membrana plasmática de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas.	85
Figura 4.19. Histogramas representativos da análise de potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas.	87
Figura 4.20. Quantificação de população na análise de potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas.	87
Figura 4.21. Ciclo celular de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com GIB-24.....	88
Figura 4.22. Avaliação da morte celular promovida por GIB-24 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	89
Figura 4.23. Microscopia Eletrônica de Varredura de epimastigotas tratados com GIB- 24 por 24 horas.	90
Figura 4.24. Microscopia Eletrônica de Transmissão de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas.	92
Figura 4.25. Microscopia Eletrônica de Transmissão de amastigotas intracelulares de infecções tratados com GIB-24 por 24 horas.	93
Figura 4.26. Curva de crescimento de epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24.....	94
Figura 4.27. Avaliação da integridade de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24.....	95



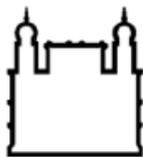
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Bases de Mannich derivadas da pirazinamida avaliadas contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
Tabela 4.2. Derivados pirazolínicos obtidos a partir de chalconas avaliados contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Tabela 4.3. Derivados antraquinônicos (com cadeias laterais: diaminas éteres / organo-halogenados ou amino-alcoois) com estrutura análoga a mitoxantrona avaliados contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
Tabela 4.4. 1,3,4-oxadiazóis obtidos a partir de reações de N-acilidrazonas em reação com anidrido acético avaliados contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
Tabela 4.5. Complexos de Rutênio avaliados contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
Tabela 4.6 Estrutura dos complexos de Rutênio avaliadas.	61
Tabela 4.7. Atividade de EPA-35 e benzonidazol (BZN) em epimastigotas (Epi) e amastigotas intracelulares (Ama) de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade em células Vero.....	63
Tabela 4.8. Valores CI para cada ponto experimental da combinação EPA-35 + Benzonidazol (BZN).	65
Tabela 4.9. Percentual de células com tamanho normal e tamanho pequeno, em relação a epimastigotas controle.	68
Tabela 4.10. Benzonidazol (BZN), diaminas terpênicas e diamina análoga ao geraniol (CGE) avaliadas na triagem contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	75
Tabela 4.11. Atividade dos compostos selecionados contra amastigotas intracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Tabela 4.12. Valores CI para cada ponto experimental da combinação GIB24 +BZN.	79
Tabela 4.13. Razão amastigotas/tripomastigotas presentes no sobrenadante das culturas após 72 horas de tratamento com GIB-24.	81
Tabela 4.14. Razão da redução de tamanho de epimastigotas tratados com GIB-24.....	83
Tabela 4.15. Porcentagens de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas e marcados apenas com Anexina-V (Anexina- / PI-; apoptose inicial), com Anexina-V+PI (Anexina+ / PI+; apoptose tardia ou necrose), ou não marcados (Anexina- / PI-; viáveis) e razão de aumento nas respectivas marcações em relação ao controle	89

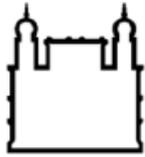


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Tabela 4.16. Enriquecimento de termos GOBP – classe de ontologia gênica de funções biológicas.....	97
Tabela 4.17. Enriquecimento de termos GOCC – classe de ontologia gênica de componentes celulares.....	101
Tabela 4.18. Enriquecimento de termos GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares.....	104
Tabela 4.19. Proteínas identificadas com diferenças significativas de expressão entre epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24 e Controle (selvagem).	110



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

LISTA DE ABREVIATURAS

BZN = Benzonidazol

CC₅₀ = Concentração Citotóxica a 50% das células

CI₅₀ = Concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

IS = Índice de Seletividade

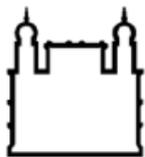
LIT = *Liver Infusion Tryptose*

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

PI = Iodeto de Propídio

Rhd = Rodamina 123



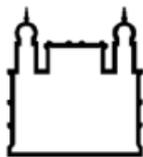
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. A DOENÇA DE CHAGAS	17
1.2. CICLO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	19
1.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	22
1.3.1. Tratamento atual: benzonidazol e nifurtimox	22
1.3.2. Busca por novos compostos	25
1.3.2.1. Produtos Naturais	25
1.3.2.1.1. Extratos de plantas.....	26
1.3.2.1.2. Óleos essenciais e constituintes.....	27
1.3.2.1.3. Flavonóides (Chalconas)	28
1.3.2.1.4. Diaminas e derivados.....	29
1.3.2.2. Produtos sintéticos.....	31
1.3.2.2.1. Moléculas complexadas a íons metálicos.....	31
1.3.2.2.2. Azlactonas e derivados	33
1.3.2.2.3. Mitoxantrona e outros inibidores de topoisomerases	33
1.4. JUSTIFICATIVA	36
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
2.3. DESENHO EXPERIMENTAL	38
3. METODOLOGIA.....	39
3.1. REAGENTES	39
3.2. CÉLULAS VERO.....	39
3.3. PARASITAS.....	40
3.4. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO	40
3.5. TRIAGEM DE COMPOSTOS CONTRA FORMAS EPIMASTIGOTAS	41
3.6. ATIVIDADE CONTRA AMASTIGOTAS INTRACELULARES	42
3.7. ATIVIDADE CONTRA TRIPOMASTIGOTAS PROVENIENTES DE CULTIVO CELULAR	42
3.8. ATIVIDADE NO CICLO INTRACELULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	42

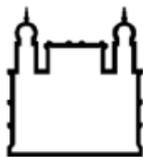


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

3.9. AFERIÇÃO DE PH DO MEIO APÓS TRATAMENTO COM GIB-24.....	43
3.10. EFEITO COMBINADO COM BENZONIDAZOL (BZN)	43
3.11. VIABILIDADE CELULAR E CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
3.11.1. Integridade de membrana plasmática.....	44
3.11.2. Potencial de membrana mitocondrial.....	44
3.11.3. Lise celular e exposição de fosfatidilserina.....	45
3.11.4. Ciclo celular	45
3.12. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	46
3.13. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	46
3.14. ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DE PARASITAS RESISTENTES A GIB-24	46
3.14.1. Seleção de epimastigotas resistentes a GIB-24.....	46
3.14.2. Curva de crescimento de epimastigotas resistentes a GIB-24.....	47
3.14.3. Integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial	47
3.14.4. Protocolo FASP (Filter-Aided Sample Preparation).....	47
3.14.5. Fracionamento dos peptídeos	48
3.14.6. Stage-tips.....	49
3.14.7. Análise por Nano LC-MS/MS.....	49
3.14.8. Análise dos dados de proteômica	50
4. RESULTADOS	52
4.1. TRIAGEM DE COMPOSTOS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.....	52
4.1.1. Compostos sem atividade seletiva.....	52
4.1.2. Compostos com atividade seletiva em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	62
4.1.2.1 Azlactonas (Anexo 2)	63
4.1.2.1.1. Triagem em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	63
4.1.2.1.2. Atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares	63
4.1.2.1.3. Quantificação de epimastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas.....	64
4.1.2.1.4. Atividade da combinação EPA-35+benzonidazol em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	64
4.1.2.1.5. Atividade de EPA-35 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	66

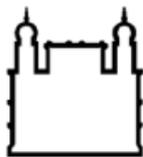


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

4.1.2.1.6. Atividade no ciclo intracelular de <i>T. cruzi</i>	66
4.1.2.1.7. Alteração de tamanho celular de epimastigotas tratadas com EPA-35	67
4.1.2.1.8. Atividade de EPA-35 na integridade de membrana plasmática e no potencial de membrana mitocondrial	68
4.1.2.1.9. Atividade de EPA-35 no ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	69
4.1.2.1.10. Exposição de fosfatidilserina pela atividade de EPA-35 em <i>T. cruzi</i>	69
4.1.2.1.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
4.1.2.1.12. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	72
4.1.2.2. Diaminas	75
4.1.2.2.1. Triagem em formas epimastigotas	75
4.1.2.2.2. Atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares	77
4.1.2.2.3. Quantificação de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas	77
4.1.2.2.4. Atividade da combinação GIB-24 / Benzonidazol em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	78
4.1.2.2.5. Atividade de GIB-24 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	79
4.1.2.2.6. Atividade tripanocida no ciclo intracelular de <i>T. cruzi</i>	80
4.1.2.2.7. Avaliação de pH do meio de culturas tratadas com GIB24.....	81
4.1.2.2.8. Alteração de tamanho celular de epimastigotas tratados com GIB-24.....	82
4.1.2.2.9. Atividade de GIB-24 na integridade de membrana plasmática.....	83
4.1.2.2.10. Atividade de GIB-24 no potencial de membrana mitocondrial.....	85
4.1.2.2.11. Atividade de GIB-24 no ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	87
4.1.2.2.12. Exposição de fosfatidilserina pela atividade de GIB-24 em <i>T. cruzi</i>	88
4.1.2.2.13. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	89
4.1.2.2.14. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	91
4.1.2.2.15. Seleção e curva de crescimento de epimastigotas resistentes a GIB-24 ..	94
4.1.2.2.16. Integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas resistentes a GIB-24	94
4.1.2.2.17. Análise do perfil proteômico de epimastigotas resistentes a GIB-24.....	95
5. DISCUSSÃO	113
5.1. AZLACTONAS	113
5.2. DIAMINAS TERPÊNICAS.....	116
6. CONCLUSÕES.....	124



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

REFERÊNCIAS	126
ANEXOS	145
ANEXO 1: ARTIGO CINAMALDEÍDO	145
ANEXO 2: ARTIGO AZLACTONAS (PROOF E O SUBMISSION)	153
ANEXO 3: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS DE EXPRESSÃO ENTRE EPIMASTIGOTAS RESISTENTES A 15 µM DE GIB-24 E CONTROLE (SELVAGEM).....	160
ANEXO 4: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS EPIMASTIGOTAS RESISTENTES A 15 µM DE GIB-24 QUE NÃO ESTÃO PRESENTES NO CONTROLE (SELVAGEM).	164
ANEXO 5: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS EPIMASTIGOTAS CONTROLE (SELVAGEM) QUE NÃO ESTÃO PRESENTES NOS EPIMASTIGOTAS RESISTENTES A 15 µM DE GIB-24.	165

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, ou tripanosomíase americana, é uma parasitose sistêmica crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Kinetoplastea). Estima-se que existam atualmente de seis a sete milhões de pessoas infectadas no mundo, a maioria na América Latina, onde a doença é endêmica (WHO, 2016).

A doença é considerada uma zoonose, já que os reservatórios naturais são marsupiais e mamíferos placentários que ocorrem no continente americano. Em humanos a doença resulta da invasão de ecótopos naturais, bem como do estabelecimento de vetores em moradias humanas devido às condições sócio-econômicas de populações rurais pobres, onde a doença é endêmica (Urbina, 2010). *T. cruzi* é naturalmente transmitido por insetos hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), os quais mantêm um típico ciclo enzoótico em uma variedade de ecótopos no continente americano (Urbina, 2010).

A manutenção do ciclo silvestre (enzoótico) acontece entre triatomíneos e animais (mamíferos) silvestres, enquanto o ciclo peridoméstico ocorre entre animais domésticos em áreas circundantes das habitações humanas, através da ação de triatomíneos peridomiciliares e, ocasionalmente, através de intercâmbios com o ciclo silvestre. O ciclo intradomiciliar, de maior importância epidemiológica pois é o que perpetua a doença a seres humanos, é mantido por meio de triatomíneos que se adaptaram ao domicílio (desenvolvendo-se em fendas e buracos dentro do domicílio, atrás dos móveis e quadros, bem como em outros pontos das residências com paredes de barro ou tijolo cru e telhados de palha), com transmissão para animais domésticos e seres humanos (Freitas, 2014).

A principal forma de transmissão em humanos se dá na forma vetorial, pelo depósito de fezes contaminadas (com formas infectivas de *T. cruzi* - tripomastigotas metacíclicas) do inseto no local de picada ou em mucosas. Outras formas de transmissão ocorrem por via oral, transfusão sanguínea ou transplacentária (Coura, 2007; Teixeira et al., 2006; Urbina, 2010; WHO, 2016). Mecanismos de transmissão menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos e leite materno (Urbina, 2010; WHO, 2016).

Devido principalmente à emigração de pessoas cronicamente infectadas da América Latina, nas últimas décadas a doença de Chagas passou a ser encontrada com maior frequência em países não-endêmicos, como Estados Unidos da América, Canadá, países do continente europeu e alguns países do Pacífico Ocidental (Basile et al., 2011; Blumental et al., 2015; Requena-Méndez et al., 2015; Urbina, 2010; WHO, 2016).

Embora a prevalência real da doença de Chagas na maioria dos países europeus continue a ser subestimada, estima-se uma prevalência de 4,2%, em média, nos países que acolhem a maioria dos imigrantes da América Latina (Blumental et al., 2015). Em 2008 mais de 38 milhões de migrantes viviam na Europa, dos quais 11% vieram da América Latina. Este valor não inclui os migrantes irregulares ou sem documentos, as pessoas nascidas fora da Europa que tenham adquirido a cidadania de um país europeu, ou crianças de países estrangeiros adotadas por famílias europeias. Assim, os números oficiais claramente subestimam o número de migrantes de áreas endêmicas, e, portanto, também o número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (Basile et al., 2011). Além disso, a elevada taxa de subdiagnóstico em sistemas de saúde europeus pode ser explicada por que a maioria dos pacientes cronicamente infectados permanece assintomática por muito tempo, os profissionais de saúde em áreas não endêmicas geralmente desconhecem esta doença, e devido à existência de barreiras ao acesso à saúde para as populações migrantes (Requena-Méndez et al., 2015).

Pessoas cronicamente infectadas, embora abrigando carga parasitária muito baixa, permanecem ao longo da vida com risco não só de desenvolver complicações cardíacas ou digestivas graves, mas também de causar a transmissão da doença a outros indivíduos. A transmissão do *T. cruzi* através de transplante, transfusão de sangue e transmissão materno-fetal é cada vez mais relatada fora da América Latina, em particular nos países do sul europeu, como Espanha e Itália, onde a imigração de latinos é mais alta (Blumental et al., 2015).

A evolução natural da Doença de Chagas é classificada em uma fase aguda seguida de uma fase crônica (Bermudez et al., 2016). A fase aguda, ou inicial, é assintomática na grande maioria dos casos (66 a 99% dos infectados), na maioria recém-nascidos e crianças (Pittella, 2009), e caracteriza-se pela presença do parasita circulante na corrente sanguínea em quantidades expressivas, podendo ser facilmente detectado na circulação periférica por exame direto com sangue fresco e pela presença de anticorpos IgM (Freitas, 2014; Ministério da Saúde, 2009). Quando se desenvolvem sintomas, as principais manifestações clínicas são inespecíficas, tais como febre, reações alérgicas, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos graves (Bermudez et al., 2016; Freitas, 2014; Ministério da Saúde, 2009). A evolução natural dessa fase, mesmo não tratada nem diagnosticada, culmina no desaparecimento espontâneo da febre e da maior parte das outras manifestações (Brasil, 2009). Gradativamente há redução de parasitemia e aumento de anticorpos IgG (Brasil, 2009).

Entretanto, em alguns casos podemos ter manifestações mais severas na fase aguda, como as ocasionadas por infecção oral com *Trypanosoma cruzi*, as quais tendem a induzir altos níveis de parasitemia, mortalidade, lesões no fígado e citocinas pró-inflamatórias INF- γ e TNF-

α (Bermudez et al., 2016). Na fase crônica é difícil a detecção dos parasitas no sangue periférico e o diagnóstico é essencialmente sorológico (anticorpos IgG). Sem tratamento a maioria dos indivíduos permanecerá assintomática por toda a vida. Nessa fase assintomática (indeterminada), o indivíduo não apresenta sintomas nem sinais de comprometimento do aparelho circulatório e do aparelho digestivo, mas apresenta sorologia (IgG) e/ou demonstração parasitológica positiva. Esse quadro pode perdurar por toda a vida do infectado ou pode evoluir tardiamente para a forma cardíaca, digestiva, ou associada (cardiodigestiva) (Coura, 2007; Dias et al., 2009; Pittela, 2009; Teixeira et al., 2006; Urbina, 2010).

A forma crônica cardíaca é a manifestação mais importante da Doença de Chagas devido à sua frequência (em torno de 30% dos chagásicos crônicos) e severidade. Os indivíduos desenvolvem arritmias, falha cardíaca e tromboembolismo em consequência da miocardite, fibrose miocárdica, destruição do sistema de condução e redução do número de neurônios cardíacos. Na forma digestiva há disfagia e constipação severa resultante de desperistaltismo do esôfago e cólon (Pittela, 2009).

1.2. CICLO DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado que apresenta um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros mamíferos e insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae. Como os ambientes apresentados ao *T. cruzi* ao longo de seu ciclo de vida são muito diferentes em suas características físico-químicas, este protozoário desenvolveu ao longo da evolução estratégias que o habilitaram a lidar com essas diferenças. Muitas das características do parasita como morfologia, ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção e de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente. Com base nestas mudanças, *T. cruzi* possui em seu ciclo de vida três formas de desenvolvimento bem caracterizadas: epimastigotas, tripomastigotas (formas não proliferativas) e amastigotas (Souza, 2007).

Com base na forma e localização do cinetoplasto em relação ao núcleo, e considerando que o flagelo livre é anterior, pode-se designar o parasita a um dos três estágios mencionados: (a) epimastigotas, medindo entre 20 e 40 μm , com a maior parte do flagelo desprendida do corpo celular e o cinetoplasto posicionado anteriormente em relação ao núcleo; (b) tripomastigotas, medem 20-25 μm de comprimento e 2 μm de diâmetro, possuem o cinetoplasto posterior ao núcleo e a maior parte do flagelo aderido ao corpo celular, formando uma membrana ondulante; (c) amastigotas, apresentando forma arredondada e com flagelo muito

curto, quase imperceptível, medem de 2 a 5 µm de diâmetro (Souza, 2002; Souza, 2007; Maya et al., 2007).

O ciclo biológico começa quando um inseto triatomíneo infectado alimenta-se do hospedeiro mamífero por sucção de sangue. Durante este repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas) são liberadas nas fezes do inseto, alcançando a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero e escapam do sistema imune invadindo vários tipos celulares como fagócitos, células musculares e do sistema retículo endotelial, além de células nervosas do coração e do trato gastrointestinal (Figura 1.1). Após a invasão celular, os parasitas escapam dos vacúolos fagolisosomais e no citoplasma se diferenciam em amastigotas, as quais proliferam por fissão binária, podendo tomar todo o citoplasma da célula hospedeira. Em seguida, amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, os quais lisam a célula hospedeira e alcançam a corrente sanguínea, sendo agora denominados tripomastigotas sanguíneos. Os tripomastigotas sanguíneos invadem outros tecidos ou células, podendo eventualmente ser ingeridos junto com o sangue durante um repasto do inseto vetor, contaminando este inseto (Souza, 2007; Nussbaum et al., 2010; Urbina, 2010).

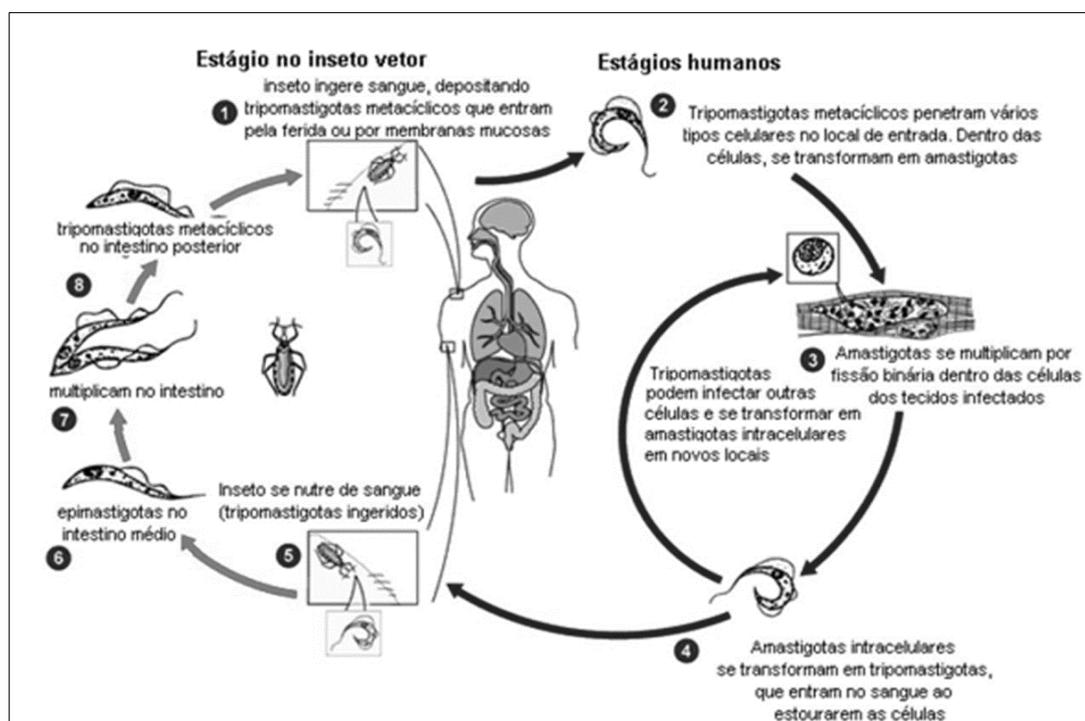


Figura 1.1. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Um inseto triatomíneo infectado (ou "barbeiro") ao se alimentar do sangue de um mamífero (neste caso o homem) libera tripomastigotas metacíclicas em suas fezes, próximo ao local de picada. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através da picada ou através de membranas mucosas intactas, como a conjuntiva. **1.** As espécies comuns de triatomíneos pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius*

e *Panstrongylus*. No interior do hospedeiro, as tripomastigotas invadem células próximas ao local de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. **2.** Os amastigotas multiplicam-se por fissão binária. **3.** Amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas e depois são liberados na circulação como tripomastigotas sanguíneos. **4.** Tripomastigotas infectam células de uma variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. As manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infeccioso. Os tripomastigotas da corrente sanguínea não se replicam, a replicação só é retomada quando os parasitas entram em outra célula ou são ingeridos por outro vetor. O barbeiro torna-se infectado pela alimentação de sangue humano ou animal que contém parasitas circulantes. **5.** Os tripomastigotas ingeridos diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor. **6 e 7.** Os epimastigotas se multiplicam no intestino médio do inseto vetor. **8.** Epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos infecciosos no intestino posterior do inseto vetor. (modificado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>).

No trato gastrointestinal do inseto as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que proliferam rapidamente e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas na porção terminal no intestino, completando o ciclo (Nussbaum et al., 2010; Urbina, 2010). O processo de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas pode ser reproduzido *in vitro* utilizando-se meio de cultivo específico (meio TAU, Triatomine Artificial Urine) que mimetiza a urina do inseto vetor (Contreras et al., 1985).

As formas clinicamente mais relevantes do *T. cruzi* são as amastigotas e as tripomastigotas, por serem as formas encontradas no hospedeiro vertebrado. As formas amastigotas são replicativas intracelulares e são as responsáveis pela manutenção da doença. Já as formas tripomastigotas são as responsáveis pela transmissão, difusão do parasita para outras células no corpo do hospedeiro vertebrado e rompimento das células hospedeiras, causando danos teciduais. Já as epimastigotas são as formas replicativas encontradas apenas no tubo digestório do inseto vetor e, portanto, sem relevância clínica. Entretanto, a maior parte dos estudos de biologia celular e de testes *in vitro* na busca de novos quimioterápicos são feitos com as formas epimastigotas, por serem estas as formas que se desenvolvem em meio de cultivo axênico, sendo facilmente mantidas em laboratório. Assim, embora epimastigotas não sejam modelos muito adequados, são as mais convenientes para a maior parte dos estudos de biologia celular (uma vez que a maior parte das vias metabólicas é similar entre as diferentes formas) e de testes de drogas (para um *screening* inicial de toxicidade).

1.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

1.3.1. Tratamento atual: benzonidazol e nifurtimox

Desde a descoberta da doença de Chagas por Carlos Chagas em 1909 (Coura, 2009; Urbina, 2015) foram feitas várias tentativas para encontrar um tratamento eficaz para a doença. Deste esforço surgiram no fim da década de 1960 dois fármacos, derivados nitro-heterocíclicos determinados empiricamente, que são até hoje os únicos utilizados no tratamento da doença de Chagas: Benzonidazol [N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida], com nome comercial de Rochagan no Brasil e Radanil na Argentina, da Roche, e o Nifurtimox {(RS)-3-metil-N-[(1E)-(5-nitro-2-furil) metileno] tiomorfolina-4-amina 1,1-dioxido}, com nome comercial de Lampit da Bayer. Ambos foram registrados originalmente para o tratamento da fase aguda da doença de Chagas e continuam sendo atualmente utilizados na fase aguda e na fase crônica inicial da doença (Bermudez et al., 2016; Coura, 2009; Maya et al., 2007; Urbina, 2010; Urbina, 2015).

Entretanto, nenhum destes quimioterápicos atende aos preceitos para um fármaco eficiente de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde, que são: (i) cura parasitológica em casos agudos e crônicos da infecção; (ii) efetividade em dose única ou em poucas doses; (iii) acessibilidade a pacientes (baixo custo e fácil de obter); (iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) sem necessidade de hospitalização de pacientes para o tratamento e (vi) sem mostrar resistência ou indução de resistência no agente etiológico (Coura, 2009; Urbina, 2010).

Ambos os compostos compartilham algumas características: maior eficácia durante a fase aguda em infecções congênicas e em adultos (>95% e 60-80% de cura parasitológica definidas pela negativação de testes parasitológicos e sorológicos convencionais, respectivamente), maior toxicidade em adultos e diferenças de susceptibilidade entre as diferentes cepas (DTUs: *Discrete Type Units*) de *T. cruzi* (Bermudez et al., 2016; Maya et al., 2007; Urbina, 2015). Além disso, há evidências da existência de cepas naturalmente resistentes ao tratamento com ambos os fármacos – cepas Colombiana, YUYU, SC-28, VL-10, Noel (Bermudez et al., 2016; Filardi e Brener, 1987; Murta et al., 1998).

A eficácia é limitada e variável durante a fase crônica da doença, mas ainda assim estudos clínicos indicam que pacientes crônicos submetidos ao tratamento com benzonidazol, apesar de não ficarem livres de parasitas, tiveram significativa redução nas alterações eletrocardiográficas e na deterioração clínica (Urbina, 2015). Segundo o guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (2009), o benzonidazol é a droga de escolha disponível

para o tratamento, sendo o nifurtimox indicado como alternativa em casos de intolerância ao benzonidazol. O tratamento tem como objetivos: curar a infecção, prevenir lesões orgânicas ou a evolução das mesmas e diminuir a possibilidade de transmissão do *T. cruzi*. Por esses motivos o tratamento é recomendado em todos os casos, incluindo casos crônicos indeterminados, forma cardíaca leve e forma digestiva, sendo eficaz na maioria dos casos agudos (>60%) e congênitos (>95%), apresentando ainda boa eficácia em 50% a 60% de casos crônicos recentes. Ambos os fármacos são tóxicos e por esse motivo não é recomendado o tratamento durante a gestação, a menos que se trate de caso agudo e grave (Ministério da Saúde, 2009).

A maior limitação dos fármacos disponíveis é a menor atividade antiparasitária na fase crônica estabelecida (tardia), que é a forma com maior prevalência, já que cerca de 80% dos pacientes crônicos tardios não são curados, de acordo com o critério clássico (negativação de todos os testes parasitológicos e dos testes de sorologia convencionais). Isso se deve, muito provavelmente, a propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, como meia-vida relativamente pequena e penetração tecidual limitada, o que limitaria o efeito dos compostos no estágio crônico, já que nesta fase os parasitas (formas amastigotas) estão em sua maioria confinados em tecidos profundos e replicam lentamente (Urbina, 2010).

Atualmente o benzonidazol é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do estado de Pernambuco (LAFEPE), após a Roche ceder os direitos e a tecnologia de produção ao Ministério da Saúde do Brasil, tornando este país o único fabricante mundial do produto (Coura, 2009; Freitas, 2014). O nifurtimox, produzido pela Bayer, tem sido o sustentáculo da terapia para a doença de Chagas nos Estados Unidos. Por mais de uma década a Bayer vem fornecendo à OMS 1 milhão de comprimidos sem custo ao ano, juntamente com assistência financeira para a sua distribuição principalmente em Honduras e El Salvador (Bermudez et al., 2016).

Ambos os fármacos atuam por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos. O grupo nitro de ambas as drogas é reduzido pela ação da nitroreductase, induzindo a formação de vários radicais livres intermediários e de metabólitos nucleofílicos (Maya et al., 2007; Oliveira et al., 2008a). A ação antiparasitária do benzonidazol ainda não está totalmente elucidada, podendo agir por stress redutivo (envolvendo a modificação covalente de macromoléculas por intermediários nitro-reduzidos), ou por interações de nitro-redução com componentes do parasita (Maya et al., 2007; Oliveira et al., 2008a). No entanto, também é relatado que benzonidazol induz o stress oxidativo no parasita, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) que reagem principalmente com o *pool* de nucleotídeos levando à quebra da cadeia dupla de DNA (Rajão et al., 2014).

O benzonidazol é apresentado na forma de comprimidos de 100 mg e deve ser usado em 2 ou 3 doses diárias, por via oral, durante 60 dias, com doses variando de acordo com a idade e

o peso do paciente. Os principais efeitos colaterais observados são a dermatopatia e a neuropatia. Distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia ocorrem em aproximadamente 10% dos casos e, mais raramente, pode ocorrer ageusia (0,5%) e hipoplasia medular (<1%) (Ministério Da Saúde, 2009).

O nifurtimox pode ser encontrado em comprimidos de 120 mg e também deve ser usado em 2 a 3 vezes ao dia, por via oral, durante 60 a 90 dias com dose variando dependendo da idade e peso do paciente (Ministério da Saúde, 2009). O mecanismo de ação do nifurtimox envolve a produção de radicais livres hidroxila (OH•) por meio da redução do grupamento nitro, o que leva a uma intoxicação do parasito (Maya et al., 2007; Oliveira et al., 2008a). Como consequência, os tecidos do hospedeiro também podem ser lesados e ocorrer reações de hipersensibilidade. Também são efeitos adversos náusea e vômito, causando severa perda de peso, insônia, irritabilidade, polineurite e diminuição da produção de células da medula óssea (Oliveira et al., 2008a; Urbina, 2010).

Devido ao caráter silencioso e crônico da doença, a grande maioria dos pacientes tem o diagnóstico confirmatório somente anos após a infecção, tornando o tratamento disponível pouco eficaz. Assim, a OMS vem incentivando estudos que possam apontar novas alternativas para o tratamento desta e outras zoonoses. Um fármaco que seja eficaz em dose única, não seja tóxico e de baixo custo com utilização tanto no tratamento de pacientes quanto para a prevenção da doença de Chagas é ainda um sonho. Existe assim uma demanda por novas terapias para doenças tropicais, incluindo a malária e doença de Chagas e, portanto, pela pesquisa e avaliação de novos compostos que possam ser ativos sobre os agentes etiológicos destas doenças (Romanha et al., 2010).

A necessidade de se estabelecer um painel de triagem que permita a identificação de um composto como um terapêutico em potencial para doença de Chagas, chegando aos ensaios clínicos, foi o tópico de discussão do workshop “Modelos Experimentais em Triagem de Drogas e Desenvolvimento para Doença de Chagas”, realizado em 2008 no Rio de Janeiro, com a participação do “Fiocruz Program for Research and Technological Development on Chagas Disease” (PIDC/ Fiocruz) e do “Drugs for Neglected Diseases Initiative” (DNDi). Foi proposta uma padronização para ensaios de triagem *in vitro* e *in vivo* de compostos ativos contra o *T. cruzi*. De acordo com essa padronização, os compostos devem ser ativos em formas tripomastigotas em concentrações iguais ou inferiores à do benzonidazol e com índice de seletividade (IS) maior ou igual a 50 para seguirem para ensaios *in vivo*, sendo assim estes parâmetros utilizados para avaliação da eficácia de um composto (Romanha et al., 2010). O benzonidazol, fármaco utilizado como controle positivo, tem valores de CI₅₀ (Concentração

Inibitória a 50%) que variam de acordo com a cepa (ou clone) de *T. cruzi* utilizada, com concentrações variando entre 2 a 13 µg/ml (Campos et al., 2010).

Dentre os vários fármacos atualmente disponíveis para o tratamento de doenças parasitárias, diversos foram extraídos de plantas ou sintetizados a partir de produtos vegetais (Schmidt et al., 2012). Assim, é relevante avaliar os efeitos de diversos derivados químicos sintéticos sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Diante do grande impacto médico-social da doença de Chagas na América Latina, inclusive no Brasil, moléculas eficazes podem trazer novas perspectivas para o desenvolvimento de um medicamento mais eficaz e menos tóxico que o benzonidazol, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida da população carente.

1.3.2. Busca por novos compostos

Considerando-se a falta de vacinas, a toxicidade das quimioterapias, os efeitos colaterais do tratamento, e a resistência dos parasitas aos fármacos disponíveis, há uma necessidade de se descobrir fármacos que possam ser utilizados como agentes terapêuticos para doença de Chagas (Alviano et al., 2012). Neste sentido, tem-se procurado por substâncias biologicamente ativas de diferentes fontes, naturais e sintéticas, como abordado nos tópicos seguintes.

1.3.2.1. Produtos Naturais

Os produtos naturais são uma fonte crescente de novas drogas que podem, em um futuro próximo, substituir os medicamentos atuais que têm efeitos colaterais graves (Izumi et al., 2011). Nos últimos anos têm sido identificados muitos produtos naturais farmacologicamente ativos derivados de plantas, com atividades antitumorais, antibacterianas ou antiparasitárias, indicando que o estudo de produtos naturais é importante na busca de novos compostos e/ou estruturas que possam ser desenvolvidas em terapias úteis para controlar doenças (Alviano et al., 2012; Izumi et al., 2011; Schmidt et al., 2012). Uma grande fração dos medicamentos recém aprovados, direta ou indiretamente (ou seja, após a modificação química ou síntese de produtos naturais ou seus análogos), têm a sua origem na natureza. Muitos quimioterápicos usados contra doenças infecciosas são produtos naturais ou derivados, sendo um exemplo disso a quinina, um alcalóide natural utilizado ainda hoje contra a malária (Schmidt et al., 2012).

Em relação ao *T. cruzi*, uma grande variedade de produtos naturais (Montesino et al., 2015; Oliveira et al., 2008; Santoro et al., 2007a,b,c.) tem sido estudada na esperança de se encontrar compostos ativos contra este parasita, desde extratos de plantas e óleos essenciais a

componentes específicos encontrados nestes produtos (Alviano et al., 2012; Izumi et al., 2011; Wink, 2012).

1.3.2.1.1. Extratos de plantas

Montesino et al. (2015) avaliou a atividade de 58 extratos obtidos a partir de preparações à base de plantas medicinais (HMPs) legalmente aprovadas e comercializadas, contra tripanosomatídeos como o *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *Leishmania donovani* e o apicomplexa *Plasmodium falciparum*, quantificando o percentual de inibição induzido por tratamentos com 2 e 10 µg/ml de cada extrato. *Plasmodium falciparum* foi o parasita mais sensível aos HMPs testados e *T. cruzi* o menos sensível, nunca excedendo 45% de inibição. Os resultados mais promissores foram obtidos com *Arnica montana* e *Salvia officinalis*, preparações mais ativas contra o *T. brucei*, agente etiológico de doença do Sono (ou tripanosomiase africana). Além disso, as maiores atividades anti-malária foram determinadas com extratos de *Curcuma longa*, *Silybum marianum* e *Hypericum perforatum*. A preparação de *Valeriana officinalis* apresentou atividade leishmanicida com um valor de CI_{50} de 2,1 µg/ml e foi a única preparação que também apresentou atividade moderada contra *T. cruzi* ($CI_{50} = 5.86$ µg/ml).

Mesia e colaboradores (2008) avaliaram a atividade de 45 extratos metanólicos de plantas da república do Congo em *T. brucei*, *T. cruzi* e *P. falciparum*. O extrato de *Alchornea cordifolia* foi o que obteve melhor atividade em *T. brucei* com IS de 91,4 ($CI_{50}/96h = 0,7 \pm 0,2$), seguido por *P. falciparum* (IS=22,8; $CI_{50}/72h = 2,8 \pm 0,6$) e *T. cruzi* (IS=1,8; $CI_{50}/96h = 34,0 \pm 3,3$). Novamente, o parasita mais sensível ao tratamento com extratos foi *P. falciparum*, o qual também foi sensível com seletividades expressivas a *Sapium cornutum* (IS=18,5), *Triclisia gillettii* (IS=17) e *Polyathia suaveolens* (IS=64). Em *T. cruzi* o extrato mais seletivo foi também o de *P. suaveolens*, entretanto com atividade muito inferior à observada em *P. falciparum* (IS>2,1; $CI_{50}/96h = 30,0 \pm 3,4$).

Calixto Júnior e colaboradores (2016) descreveram as atividades antiparasitárias e citotóxicas de três espécies de plantas do Cerrado, bioma do Nordeste do Brasil. Ao avaliar a atividade anti-*Leishmania*, o melhor resultado foi observado com extrato etanólico de folhas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae), com EC_{50} de 316,54 µg/ml em promastigotas de *Leishmania infantum* e 282,63 µg/ml em promastigotas de *L. brasiliensis*. Os demais extratos mostraram resultados de baixa a moderada atividade anti-promastigota, sem mortalidade celular com o extrato etanólico do tecido entrecasca de *Luehea paniculata* (Malvaceae) em concentrações de 500 e 250 µg/ml. Todos os extratos, exceto o de folhas de *Guazuma ulmifolia*,

apresentaram valores de EC₅₀ superiores a 850 µg/ml em testes anti-*Leishmania*. Em *T. cruzi*, o melhor resultado também foi observado para o extrato das folhas de *G. ulmifolia*, com EC₅₀ de 454,68 µg/ml. Nos testes de citotoxicidade todos os produtos foram considerados citotóxicos, com citotoxicidade acima de 50% na maior concentração avaliada (1000 µg/ml). Em concentrações nas quais a citotoxicidade foi baixa (extratos de *L. paniculata* e *Prockia crucis*), os efeitos antiparasitários foram irrelevantes.

1.3.2.1.2. Óleos essenciais e constituintes

Óleos essenciais (OE) são líquidos, voláteis, lípidos, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com uma densidade geralmente inferior à da água. Podem ser sintetizados por todos os órgãos de uma planta (brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, entre outros). São misturas naturais complexas que contendo cerca de 20-60 componentes a concentrações bastante diferentes. Os componentes incluem dois grupos de origem biossintética distinta: (1) terpenos e terpenoides e (2) constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular. (Bakkali et al., 2008)

Medeiros e colaboradores (2011) estudaram a atividade do OE de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e seu principal constituinte, timol, sobre *Leishmania amazonensis*, encontrando atividade em formas promastigotas (CI₅₀ = 44,38 µg/ml; IS=4,91) e amastigotas intracelulares (CI₅₀ = 34,4 µg/ml; IS=6,32). Timol também foi ativo, mas apresentou toxicidade sobre macrófagos peritoneais. Dentre as alterações na morfologia de parasitas tratados com este OE houve acúmulo de inclusões lipídicas próximo à membrana plasmática (que podia estar enrugada ou rompida), perda de conteúdo citoplasmático e inchaço (*swelling*) dos parasitas. Segundo os autores, tais alterações morfológicas são compatíveis com perda de viabilidade celular e morte por necrose, e com o efeito deletério do OE na membrana plasmática.

Oliveira e colaboradores (2008b) analisaram a atividade sobre promastigotas de *L. chagasi* dos OEs de *Cymbopogon citratus* (capim-limão; CI₅₀ = 45 µg/ml), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta; CI₅₀ = 89 µg/ml) e *Ocimum gratissimum* (orégano; CI₅₀ = 75 µg/ml). Tais tratamentos induziram o aparecimento de células aberrantes, com processos mitóticos anormais, aumento de elétrons-densidade nas inclusões lipídicas, vacuolização do citoplasma, inchaço do corpo celular, da bolsa flagelar, da mitocôndria e dos acidocalcisomos. Também se observou aumento de permeabilidade celular (por citometria de fluxo) em parasitas tratados com o OE de *C. citratus*, sugerindo que este OE pode ter entrada passiva pela membrana plasmática e resultando em seu acúmulo no local e aumento da permeabilidade de membrana.

Os OEs de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) mostraram atividade sobre formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (Santoro et al., 2007a, 2007b). Em formas epimastigotas, os OEs de orégano e tomilho foram efetivos com $CI_{50} = 175 \mu\text{g/ml}$ e $77 \mu\text{g/ml}$, e em tripomastigotas sanguíneas com $CI_{50} = 115 \mu\text{g/ml}$ e $38 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Timol, o principal constituinte do OE de *T. vulgaris*, foi mais efetivo que o OE total, com $CI_{50} = 62 \mu\text{g/ml}$ em epimastigotas e $53 \mu\text{g/ml}$ em tripomastigotas (Santoro et al., 2007b). Eugenol (principal constituinte do OE de *S. aromaticum*) e linalol (principal constituinte do OE de *O. basilicum*) foram efetivos em epimastigotas ($CI_{50} = 246$ e $162,5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) e tripomastigotas sanguíneas ($CI_{50} = 76$ e $264 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) (Santoro et al., 2007a).

Escobar e colaboradores (2010) investigaram a atividade tripanocida e leishmanicida de OEs extraídos de diferentes espécies de *Lippia*. O OE de *Lippia alba* exibiu maior atividade sobre *T. cruzi* ($CI_{50} = 5,5 \mu\text{g/ml}$ em epimastigotas; $CI_{50} = 12,2 \mu\text{g/ml}$ em amastigotas intracelulares; $IS=2,5$). O OE de *L. origanoides* teve $CI_{50} = 4,4 \mu\text{g/ml}$ em promastigotas de *Leishmania chagasi*, mas exibiu toxicidade sobre células de mamíferos. Timol e S-carvona, dois dos componentes majoritários destes OEs, foram ativos em amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, com IS maior que 10, mas não foram ativos em amastigotas de *L. chagasi*.

1.3.2.1.3. Flavonóides (Chalconas)

Chalconas são flavonóides de cadeia aberta, constituídos por dois anéis arilo (anéis A e B) ligados por uma porção carbonilo α,β -insaturada, sintetizados predominantemente por plantas, sendo precursores em várias vias bioquímicas, desde a pigmentação das flores até a defesa biológica contra fitopatógenos e insetos (Roussaki et al., 2013). A sua estrutura simples e a facilidade de preparo tornam as chalconas atrativos para a síntese de um grande número de derivados que permitem avaliar os efeitos de diferentes grupos funcionais sobre as atividades biológicas (Passalacqua et al., 2015).

Chen e colaboradores (2001) investigaram o mecanismo de ação de chalconas, com foco na cadeia respiratória de *Leishmania*, mostrando que a licochalcona A inibiu a atividade da fumarato redutase (FRD) em promastigotas de *Leishmania major* e de *L. donovani*. Duas outras chalconas, 2,4-dimetoxi-49-aliloxichalcona (24m4ac) e 2,4-dimetoxi-49-butoxichalcona (24mbc), também exibiram efeitos inibitórios na atividade de FRD solubilizado em promastigotas de *L. major*.

Passalacqua e colaboradores (2015) estudaram o efeito de chalconas preniladas sintéticas sobre a viabilidade de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *T. cruzi*. Das chalconas preniladas sintéticas avaliadas, (*E*)-2-*O*-farnesyl-chalcona foi a mais seletiva em ambas as espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis* IS em amastigotas = 48,5; *L. infantum* IS em amastigotas = 62,79), provavelmente devido à presença da cadeia prenil de 15 carbonos de *O*-farnesil, o qual contribui para um aumento da lipofilicidade. Para *T. cruzi*, (*E*)-2-*O*-isoprenyl-chalcone (IS=5,16), (*E*)-3-*O*-geranyl-chalcone (IS=3,12) e (*E*)-3-*O*-farnesyl-chalcone (IS=2,32) apresentaram potência semelhante em formas epimastigotas, variando de 21 a 26 µM, cinco vezes menos ativos do que o benzonidazol.

Ryczak e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antiparasitária de uma série de moléculas híbridas de paulona-chalconas em formas sanguíneas de *T. brucei rhodesiense* e sua citotoxicidade em células THP-1 humanas. Após a avaliação e síntese de moléculas objetivando melhorar a seletividade das moléculas, identificaram 9-*tert*-butil-2-(4-morfolinofenil) paulona como o composto mais potente (GI₅₀ = 510 nM) com um índice de seletividade de 157. Os autores ressaltam ainda que a substituição parcial da estrutura de propenona por anéis de arilo nos precursores de 9-*tert*-butil-2-(4-morfolinofenil) paulona melhoraram os perfis de citotoxicidade.

Estes achados justificam uma nova campanha de concepção e síntese de 2-arilpaulonas como agentes tripanocidas (Ryczak et al., 2013) e de forma mais abrangente ilustram o potencial do uso de chalconas como precursores de novos compostos a serem avaliados como possíveis anti-tripanosomatídeos.

1.3.2.1.4. Diaminas e derivados

Outro grande grupo que tem sido avaliado quanto ao seu potencial tripanocida é o das poliaminas chamadas diaminas. As poliaminas naturais (putrescina, espermidina e espermina) são cátions orgânicos em células eucarióticas e procarióticas essenciais para o crescimento celular e diferenciação (Reigada et al., 2016; Yamanaka et al., 2013). Compostos que interferem com o metabolismo ou função de poliaminas são potenciais terapias ou agentes de proteção para doenças, incluindo câncer e doenças parasitárias como a malária, leishmaniose e tripanosomíase (Yamanaka et al., 2013).

As poliaminas podem ser obtidas por síntese *de novo* a partir da ornitina e, em alguns casos, da arginina, ou transportadas a partir do meio extracelular (Colotti e Ilari 2011). Em contraste com outros protozoários parasitas, *T. cruzi* é auxotrófico para poliaminas devido à sua incapacidade de sintetizar putrescina devido à falta de arginina descarboxilase (ADC) e ornitina

descarboxilase (ODC) (Carrillo et al., 1999, 2003). Portanto, a disponibilidade intracelular de poliaminas no *T. cruzi* depende exclusivamente dos processos de transporte (Reigada et al., 2016).

Na maioria dos organismos, a glutatona é um antioxidante importante e os níveis deste tiol são mantidos pela ação da glutatona redutase (GR). Entretanto, os tripanosomatídeos têm um metabolismo redox mais simples que os mamíferos e não contêm GR, glutatona peroxidase, ou catalase. Tripanosomatídeos contêm glutatona, no entanto, a tripanotiona [T (SH)₂], formada por um conjugado espermina-glutatona, é o tiol central no seu metabolismo redox. Compostos que interferem com a manutenção dos níveis de T(SH)₂ por conjugação com a T(SH)₂, por inibição da síntese de poliaminas e outros componentes de T(SH)₂, ou por inibição de tripanotona redutase [TR; enzima responsável por reduzir o dissulfeto de tripanotona (T(S)₂, regenerando o níveis de T(SH)₂], têm potencial para ser agentes contra tripanosomatídeos (O'Sullivan et al., 2015).

Alguns inibidores da biosíntese da poliamina individuais já produziram ferramentas clinicamente úteis, particularmente para o tratamento de doenças parasitárias (Yamanka et al., 2013). De fato, alguns medicamentos atuais afetam T(SH)₂, embora isso possa não ser a ação terapêutica principal destas drogas. Por exemplo: D,L- α -difluorometil ornitina (DFMO, usado para tratar a tripanosomíase africana) inibe a síntese de putrescina (1,4-diaminobutano), um componente do T(SH)₂; pentamidina (usada para tratar a leishmaniose) inibe o transporte de poliaminas em *L. infantum* e *T. cruzi* (O'Sullivan et al., 2015).

Benítez e colaboradores (2016) triaram a atividade de várias diaminas sintéticas como possíveis inibidoras da atividade da tripanotona sintetase (TryS), enzima que catalisa a ligação glutatona e espidina formando a tripanotona, e portanto, essencial para o sistema redox de tripanosomatídeos. Neste trabalho observaram que os derivados de 6-arilpirido[2,3-d] pirimidina-2,7-diamina são inibidores moderados de, preferencialmente, TryS de *T. cruzi* e estão estruturalmente relacionados com compostos originalmente concebidos como inibidores da D-Ala:D-Ala ligase bacteriana. Os derivados de N,N'-bis(3,4-benzil) diamina (BDA) também exibiram atividade inibidora, embora moderada (IC₅₀ ~ 30 μ M), contra múltiplas TryS (*L. infantum*, *T. brucei*, *T. cruzi*).

O estudo de derivados de diamina, portanto, é uma estratégia que objetiva a ação sobre as poliaminas naturais, e em tripanosomatídeos o principal alvo seria a tripanotona T(SH)₂ e/ou componentes de sua via metabólica, o que tornaria a atividade do composto bastante específica visto que este sistema é essencial e único a esses protozoários (Flohé, 2012). Desta forma, vários grupos já mostraram a atividade de diaminas lipídicas (Sales Júnior et al., 2014), diaminas alifáticas (Yamanaka et al., 2013), diaminas de cadeia longa (Legarda-Ceballos et al., 2015),

diaminas lipofílicas (Calixto Júnior et al., 2010), entre outras abordagens de derivações, com resultados bastante interessantes.

Ao avaliarem a atividade de diaminas lipídicas contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, Sales Júnior e colaboradores (2014) encontraram atividade em concentrações de 2,46-18,41 μM , observando um aumento de aproximadamente 10x em relação à atividade encontrada contra formas tripomastigotas sanguíneas. Tal resultado sugere que diaminas lipídicas são bons protótipos para possíveis novas drogas e que tem a possibilidade de ação com mais eficácia e mais especificamente na fase crônica da doença, caso estes resultados *in vitro* se reproduzam em ensaios *in vivo*.

De forma semelhante Yamanaka e colaboradores (2013) ao avaliar o efeito de diaminas alifáticas sobre *T. cruzi* mostram que os compostos ativos, em sua maioria, foram mais ativos que benzonidazol quando avaliados em formas epimastigotas. Em formas amastigotas, a atividade destas diaminas foi ainda maior, com um aumento significativo na seletividade, a qual variou de 9,4 a 194,1.

1.3.2.2. Produtos sintéticos

Uma outra alternativa na busca por compostos ativos é o estudo de moléculas sintetizadas, as quais normalmente são idealizadas a partir de outras com atividade já conhecida. Muitas drogas usadas contra doenças infecciosas são produtos naturais ou derivados (Schmidt et al., 2012), obtidas por exemplo a partir de uma molécula extraída de um produto natural que possui atividade contra um determinado patógeno, podendo ser feitas alterações na molécula (inserções de radicais) buscando melhorar sua atividade ou tornando-a mais específica.

1.3.2.2.1. Moléculas complexadas a íons metálicos

Um grupo de moléculas que tem sido bastante investigado contra tripanosomatídeos é o de moléculas complexadas a íons metálicos, normalmente moléculas orgânicas complexadas a platina, paládio ou rutênio (Corrêa et al., 2016; Santos et al., 2012; Sesti-Costa et al., 2014; Vieites et al., 2011). Várias tentativas estão em andamento para desenvolver novos compostos tripanocidas a base de metal (Corrêa et al., 2016; Navarro et al., 2010; Sesti-Costa et al., 2014; Santos et al., 2012; Vieites et al., 2011), em sua maioria inspirados nas três seguintes estratégias: coordenação de metal com ligantes tripanocidas (Sesti-Costa et al., 2014), coordenação de metal com intercaladores de DNA (Benítez et al., 2009) e compostos metálicos como inibidores de enzimas do parasita (Fricker et al., 2008; Navarro et al., 2010; Vieites et al., 2008). Espera-

se com tal abordagem que a atividade biológica da droga complexada ao íon metálico seja aumentada (possivelmente devido a um maior tempo de residência da droga no organismo, permitindo-lhe alcançar os alvos biológicos de forma mais eficiente) e que ocorra uma redução na toxicidade do íon metálico – visto que o acoplamento ao fármaco orgânico transporta o íon para o local de ação específica diminuindo a disponibilidade para reações indesejáveis, como a inibição de enzimas (Navarro et al., 2010; Sánchez-Delgado e Anzellotti, 2004).

Como resultados destas estratégias podemos citar a coordenação do clotrimazol (inibidor da biossíntese de esterol) com rutênio que resultou em inibição de 90% na proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* a uma concentração de 10^{-5} M, enquanto clotrimazol foi pouco efetivo sobre a taxa de crescimento à mesma concentração. Além disso, ao passo que o fármaco parental produziu um efeito tripanostático, o complexo RuCl_2 foi tripanocida (Sánchez-Delgado e Anzellotti, 2004).

Sesti-Costa e colaboradores (2014) avaliaram a complexação de rutênio a óxido nítrico (NO) e benzonidazol (RuBzNO_2) contra *T. cruzi*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstrando que RuBzNO_2 foi mais eficaz do que as mesmas concentrações de benzonidazol (Bz) em eliminar tanto tripomastigotas extracelulares ($\text{CI}_{50} \text{RuBzNO}_2 = 7,28 \mu\text{M}$; $\text{CI}_{50} \text{Bz} = 110,48 \mu\text{M}$) quanto amastigotas intracelulares do parasita. $50 \mu\text{M}$ de RuBzNO_2 diminuiu a infecção na mesma proporção que tratamento com $200 \mu\text{M}$ de Bz, com nenhum efeito citotóxico em células de camundongo. Além disso, o tratamento *in vivo* com o composto melhorou a sobrevivência de camundongos infectados, inibindo danos cardíacos mais eficientemente do que somente Bz.

Fricker e colaboradores (2008) avaliaram a atividade de complexos oxorhenium (V), de complexos de paládio (II) e ouro (III) contra cisteíno-proteases de mamíferos e de parasitas. Os complexos 14 {(p-metoxifeniltiolato-S) [2,6-bis [(mercapto-κS) metil] piridina-JN1} oxorhenium (V); 18 (metanotiolato) [2,20-(tiokS) bis (etanotiolato-Js)] oxorhenium (V) e o composto de paládio 11 (Pd(II)aceto[2,6-bis[(butiltio-κS)metil]phenil-κC] inibiram o crescimento intracelular de *T. cruzi* em concentrações de $10 \mu\text{M}$ para os compostos 14 e 18 e de $1 \mu\text{M}$ para o composto 11. O composto 11 também inibiu o crescimento de promastigotas em três espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. mexicana* e *L. donovani*), mas a uma concentração de $10 \mu\text{M}$. Entretanto, não houve evidência de inibição de crescimento intracelular.

Estes exemplos ilustram que a estratégia de coordenação de compostos com íons metálicos é promissora, justificando os vários estudos ainda em andamento.

1.3.2.2.2. Azlactonas e derivados

O grupo das oxazolonas é constituído por cinco membros de compostos heterocíclicos, contendo nitrogênio e oxigênio como heteroátomos (átomos diferentes de carbono e hidrogênio). Oxazolonas desempenham um papel importante na síntese de várias moléculas orgânicas, incluindo aminoácidos, amino álcoois, tiamina, amidas, peptídeos e compostos polifuncionais (Bala et al., 2011).

Oxazol-5(4H)-onas, também conhecidas como azlactonas, são facilmente preparados a partir de aminoácidos N-protetidos (Ávila et al, 2012; Ávila et al., 2013; Ávila et al., 2015; Barbosa et al., 2015; Gottwald e Seebach, 1998; Pereira et al., 2015; Pinheiro et al., 2016). Em virtude da sua fácil disponibilidade e diversas reações, existe uma enorme possibilidade de utilizar azlactonas como blocos de construção para vários produtos comerciais importantes, tais como medicamentos (Bala et al., 2011; Mukerjee, 1987).

As azlactonas Erlenmeyer são bem conhecidas por estarem envolvidas em uma série de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-HIV, anti-angiogênica, anticonvulsivante e antitumoral (Bala et al., 2011). Apesar de terem várias aplicações biológicas já conhecidas, até o momento nenhum relato sobre atividade antiparasitária destes compostos é encontrado na literatura.

1.3.2.2.3. Mitoxantrona e outros inibidores de topoisomerases

Mitoxantrona {1,4-di-hidroxi-5,8-bis [2-(2-hidroxietilamino) etilamino]-antraquinona} é um derivado de antraquinona com atividade antineoplásica, que inibe a atividade da topoisomerase II (Deterding et al., 2005; Luty et al., 2016). Também se intercala no DNA, interferindo com a proliferação de células cancerosas (Luty et al., 2016). Topoisomerases (Top) são enzimas responsáveis pelo relaxamento do DNA super-enrolado, introduzindo quebras em uma ou ambas as cadeias da dupla hélice, desempenhando papéis no metabolismo desta, tais como replicação, transcrição, recombinação e condensação. Esta tarefa pode ser alimentada por hidrólise de ATP ou não. De acordo com o número de quebras de cadeia de DNA introduzidas e a exigência de energia metabólica, as topoisomerases são divididas em duas famílias. Dois tipos de Top foram caracterizados: (a) Top I, introduz quebras transientes em fita simples de DNA, independente de hidrólise de ATP; (b) Top II, que necessita da hidrólise de ATP para promover quebras transientes em fita dupla de DNA (Balaña-Fouce et al., 2014; Deterding et al, 2005; Zuma et al., 2011).

Um conjunto completo de topoisomerases está disponível no banco de dados genômico TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) mostrando a presença de (I) as enzimas Top IB e Top IIA nucleares envolvidas na replicação e reparação do DNA, que foram completamente descritas como alvos putativos de fármaco; (II) Top IA mitocondrial e Top II que foram descritos estreitamente ligados à replicação de kDNA; (III) dois membros putativos da subfamília Top IA Top III envolvidos na resolução de emaranhados de DNA que podem surgir durante a recombinação de DNA (Balaña-Fouce et al., 2014).

Deterding e colaboradores (2005) avaliaram a atividade de 15 inibidores de DNA topoisomerase em tripomastigotas sanguíneos de *T. brucei* (aclarrubicina, ácido aúrico tricarbóxico, ácido elágico, elipticina, eriocromo preto T, mitoxantrona, rebecamicina, 10-hidroxi-camptotecina, camptotecina, etoposido, β -lapachona, topotecano, doxorrubicina, irinotecano e 7-etil-10-hidroxi-camptotecina). Observaram que todos os inibidores avaliados tiveram atividade no parasita, sendo que os mais ativos foram aclarrubicina e doxorrubicina, com valores de ED₅₀ de 0,0033 e 0,027 μ M, respectivamente, e a mitoxantrona antracenodiona, com um valor de ED₅₀ de 0,0026 μ M. A atividade anti-tripanicida destes inibidores de DNA topoisomerase foi comparável à das drogas anti-tripanosoma comerciais isetionato de pentamidina (ED₅₀ = 0,001 μ M) e suramina (ED₅₀ = 0,13 μ M) previamente determinada para formas sanguíneas de *T. brucei*.

Zuma e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de efeitos de vários inibidores de topoisomerase e drogas de ligação ao DNA (rebecamicina, camptotecina, mitoxantrona, merbarona, berenil, distamicina A, norfloxacina e enoxacina) em *T. cruzi* e *Blastocrithidia culicis*. Os resultados mostraram que inibidores de topoisomerase I camptotecina e rebecamicina foram os compostos mais eficazes para impedir a proliferação *T. cruzi*. Dos inibidores eucarióticos de topoisomerase II, mitoxantrona, mas não merbarona, foi eficaz contra a proliferação celular. Os inibidores procarióticos de topoisomerase II norfloxacina e enoxacina agiram especificamente no cinetoplasto, promovendo o rearranjo do kDNA em *B. culicis*. Das drogas de ligação ao DNA, berenil causou notável desorganização do kDNA.

Uma outra abordagem foi desenvolvida por Moshiri e colaboradores (2015), os quais triaram uma biblioteca de compostos farmacologicamente ativos (LOPAC₁₂₈₀) utilizando rastreio de alto rendimento (*high-throughput screening*) para identificar inibidores de edição de RNA. Com essa metodologia identificaram o ácido aúrico tricarbóxico, a mitoxantrona, o PPNDS e NF449 como potentes compostos na eliminação da edição de RNA, com CI₅₀ variando de 1 a 5 μ M. Mitoxantrona foi capaz de bloquear a edição através da indução de agregados de RNA-proteína, ao passo que os outros três compostos interferiram com interações editosomo-RNA em graus diferentes.

Agentes que afetam DNA topoisomerasas tem sido mais extensivamente estudados como agentes antineoplásicos, mas em tripanosomatídeos os estudos existentes ainda são menos abrangentes (Zuma et al., 2011).

1.4. JUSTIFICATIVA

A literatura e as abordagens utilizadas na avaliação de compostos em tripanosomatídeos são extensas, como demonstrado pela breve revisão apresentada nesta tese. Entretanto, apesar de todos os esforços realizados na triagem e avaliação de compostos contra o *T. cruzi* desde o aparecimento do benzonidazol e do nifurtimox - lançados na década de 1970 (Bermudez et al., 2016) - como tratamentos para a doença de Chagas, ainda não foi encontrado um outro composto com atividade contra o *T. cruzi* que se traduziu em um novo fármaco.

Moléculas promissoras em ensaios *in vitro* não demonstraram a mesma eficiência em testes clínicos, como observado com Posaconazol (Chagasol) e Ravuconazol (E1224). Os resultados recentes de testes clínicos indicam que eles têm menor eficácia que o benzonidazol em promover uma redução sustentada da parasitemia (Chatelain, 2014; Urbina, 2015). Esses resultados podem ser devido à falta de biomarcadores validados de respostas a tratamentos etiológicos e eventuais curas parasitológicas em pacientes crônicos, ou devido às formulações utilizadas nas avaliações, sendo que outras avaliações podem ser esperadas para esses compostos (Urbina, 2015).

Assim sendo, a realidade é que nós ainda temos apenas o benzonidazol ou o nifurtimox como fármacos disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas, os quais promovem inúmeros efeitos colaterais indesejáveis e tem eficácia ainda muito discutida, principalmente na fase crônica da doença. Portanto, a triagem e avaliação de compostos de diferentes estruturas químicas contra o *Trypanosoma cruzi* ainda é uma importante área de investigação, na qual esta tese espera contribuir.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de derivados naturais e sintéticos na viabilidade e crescimento de *Trypanosoma cruzi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Triar a atividade inibitória de compostos químicos sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, utilizando o método colorimétrico do MTT, através do cálculo da Concentração Inibitória para 50% da cultura (CI₅₀/24h).
- B. Triar a atividade citotóxica de compostos sobre células Vero, utilizando o método colorimétrico do MTT, através do cálculo da Concentração Citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀/24h).
- C. Selecionar compostos ativos pelo Índice de Seletividade (IS)
- D. Avaliar a atividade dos compostos selecionados, sobre formas tripomastigotas provenientes de cultura celular, através do cálculo da CI₅₀/24h.
- E. Avaliar a atividade dos compostos selecionados sobre formas amastigotas intracelulares, utilizando o percentual de inibição (PI) para o cálculo da CI₅₀/24h.
- F. Avaliar a combinação de diferentes concentrações dos compostos selecionados com benzonidazol, contra formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- G. Avaliar alterações na membrana plasmática de *T. cruzi* tratados por 24 horas com os compostos selecionados, por citometria de fluxo.
- H. Avaliar alterações no potencial de membrana mitocondrial e na viabilidade de *T. cruzi* tratados por 24 horas com os compostos selecionados, por citometria de fluxo.
- I. Avaliar se há exposição de fosfatidilserina de *T. cruzi* tratados por 24 horas com os compostos selecionados, por citometria de fluxo.
- J. Avaliar o ciclo celular de *T. cruzi* tratados por 24 horas com os compostos selecionados, por citometria de fluxo.
- K. Avaliar a morfologia de epimastigotas tratados por 24 horas com a CI₅₀/24h com os compostos selecionados, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- L. Avaliar o perfil de proteínas presentes em epimastigotas resistentes a GIB-24, comparando ao perfil de epimastigotas controle, por espectrometria de massas.

2.3. DESENHO EXPERIMENTAL

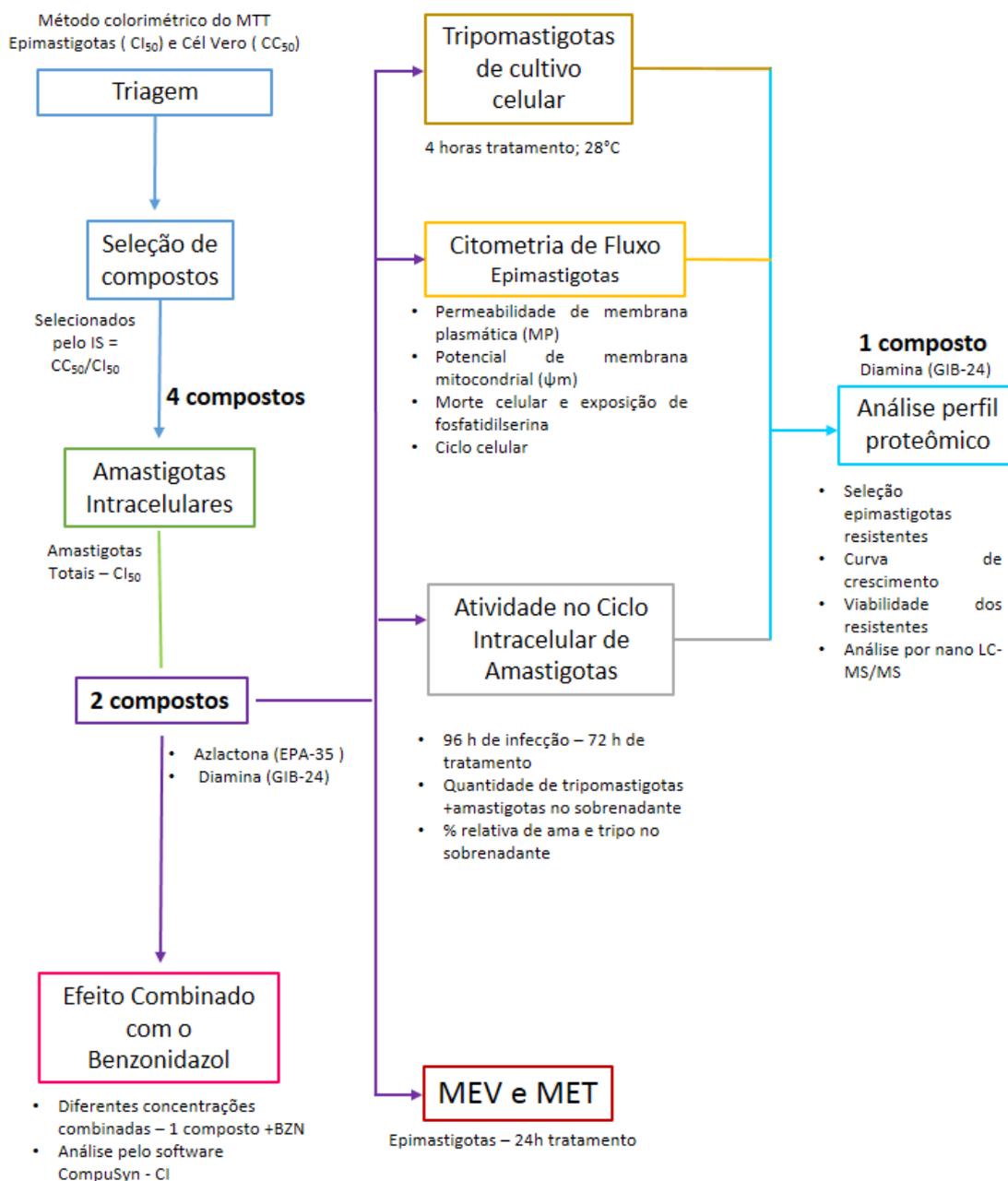


Figura 2.1. Esquema do desenho experimental da tese. Os compostos foram triados em formas epimastigotas, sendo selecionados os 4 maiores IS para avaliação em amastigotas intracelulares. Diferentes avaliações (Combinação com benzonidazol; efeito em tripomastigotas; efeito no ciclo intracelular de amastigotas; morfologia por MEV e MET; permeabilidade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, morte celular e ciclo celular por citometria de fluxo) foram feitas apenas com dois dos compostos, representativos das classes químicas selecionadas (azlactonas e diaminas). Análise do perfil proteômico foi realizada apenas com o representante da classe de diaminas.

3. METODOLOGIA

3.1. REAGENTES

- **Cultilab:** soro fetal bovino (SFB)
- **Difco:** bacto triptona, extrato de levedura, infuso de fígado, triptose
- **Gibco:** penicilina-estreptomicina
- **Invitrogen:** rodamina 123 (Rhd), iodeto de propídio (PI)
- **Merck:** ácido clorídrico, acetonitrila, ácido fórmico, ácido trifluoracético bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, glicina, glicose, metanol, SDS, sulfato de magnésio, hidróxido de sódio, fosfato diabásico de sódio, dihidrogenofosfato de potássio
- **Microbiológica:** hemina
- **Promega:** tripsina
- **Sigma-Aldrich:** acetato de amônia, ácido bórico, aspartato sódico, cinamaldeído, corante Giemsa modificado, glutamato sódico, L-prolina, brometo de tiazol azul de tetrazólio (MTT), meio DMEM baixa glucose, dimetil sulfóxido (DMSO), cinamaldeído, nerolidol, benzonidazol, dodecil sulfato de sódio (SDS), ditioneitol (DTT), uréia, iodacetamida, bicarbonato de sódio, hidróxido de amônio,
- **USB Corporation:** persulfato de amônio

3.2. DERIVADOS QUÍMICOS

Os derivados químicos (mencionados nas tabelas da seção 4.1 e 4.2 dos Resultados) foram sintetizados pelo departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG) e obtidos em colaboração com o Dr. Mauro Almeida. Todos os compostos químicos, incluindo cinamaldeído, nerolidol e benzonidazol (controle positivo), foram solubilizados a 100 mM em DMSO e armazenados a 4°C.

3.2. CÉLULAS VERO

Para os ensaios de citotoxicidade e de atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares foram utilizadas células Vero (ATCC: CCL-81) como células hospedeiras (linhagem isolada de células epiteliais de rim de macaco-verde (*Cercopithecus aethiops*)). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada de CO₂ em garrafas de cultura de 75

cm², em meio DMEM pH 7,4 +10% SFB acrescido de 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml estreptomicina e 100 UI/ml penicilina.

Para os bioensaios, as monocamadas de células Vero foram lavadas com PBS (salina tamponada por fosfato: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄) pH 7,2 e tratadas por 5 minutos a 37°C com 0,25% tripsina / 0,1% EDTA. Em seguida as células foram lavadas em meio DMEM pH 7,4 + 10% soro fetal bovino (SFB), centrifugadas a 700 rpm por 4 minutos a 4°C e resuspensas no mesmo meio. A concentração foi ajustada para 10⁶ células/ml e estas foram semeadas em placas de 96 poços (2x10⁴ células/poço) para os ensaios de citotoxicidade, e em placas de 24 poços (6x10⁴ células/poço) para os ensaios de atividade antiparasitária, em meio DMEM + 10% SFB, e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram utilizadas para os bioensaios de citotoxicidade e de atividade antiparasitária.

3.3. PARASITAS

Os compostos foram avaliados contra o clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. Formas epimastigotas foram mantidas a 28°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*; 0,5% infuso de fígado, 75,3 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM glicose, 0,5% bacto-triptose, 56,4 mM Na₂HPO₄, 0,0025% hemina, 10% SFB e 15 g/l extrato de levedura) contendo 10% de SFB, através de repiques a cada três ou quatro dias (fase log de crescimento).

Formas tripomastigotas foram obtidas a partir de células Vero previamente infectadas. Após 3 a 4 dias de infecção os tripomastigotas presentes no sobrenadante da cultura foram coletados, centrifugados a 3000g por 10 min, suspensos em DMEM+ 10% SFB e utilizados ou para uma nova infecção, ou para avaliação da atividade antiparasitária dos compostos selecionados.

Para a obtenção de formas amastigotas intracelulares, células Vero previamente semeadas em placas de 24 poços foram infectadas com tripomastigotas provenientes de cultivo celular, na proporção de dez parasitas por célula Vero. Após quatro horas de interação, as monocamadas foram lavadas duas ou três vezes com PBS para remoção dos parasitas não interiorizados, as culturas foram mantidas por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂ em 1 ml de DMEM + SFB 10%, e então usadas nos testes com os compostos.

3.4. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

Células Vero semeadas em placas de 96 poços foram incubadas com diferentes concentrações (20 a 500 µM) dos compostos por 24 horas, nas mesmas condições descritas no

item 3.4. A integridade do tapete celular foi controlada em microscópio invertido Nikon Eclipse E600, seguindo-se o ensaio colorimétrico do MTT. Após incubação com os compostos acrescentou-se 50 µl de MTT (solubilizado a 2 mg/ml em PBS), a placa foi envolta em papel alumínio e então incubada a 37°C. Após 3 horas o meio foi removido por inversão brusca da placa e foi acrescentado 100 µl de DMSO. A placa foi agitada manualmente para solubilização dos cristais de formazan e a leitura da densidade ótica (O.D.) foi efetuada a 550 nm em leitor de ELISA marca EL800 da Biotek (Winooski, VT, USA). Os valores de $CC_{50}/24h$ (concentração citotóxica para 50% da população) foram estimados a partir dos valores médios obtidos de triplicatas técnicas, por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

3.5. TRIAGEM DE COMPOSTOS CONTRA FORMAS EPIMASTIGOTAS

Formas epimastigotas com três dias de cultivo foram suspensas em meio LIT, com concentração ajustada para 1×10^7 epimastigotas/ml. Desta suspensão, 180 µl/poço foram semeados em placas de 96 poços e incubados com 20 µl dos compostos avaliados diluídos a diferentes concentrações. Como controle positivo e negativo foram utilizados benzonidazol e o solubilizante DMSO a 1%, respectivamente. Avaliou-se a atividade antiparasitária através da técnica do MTT. Após incubação por 24 horas a 28°C acrescentou-se 50 µl de MTT (solubilizado a 10 mg/ml em PBS) em todos os poços (concentração final: 2 mg/ml por poço) e a placa, envolvida em papel alumínio, foi incubada a 37°C. Após 3h a placa foi centrifugada por 10 min a 1.700 rpm e o meio foi removido por inversão brusca da placa. O pellet de parasitas foi resuspenso em 20 µl de SDS a 10% em 0,01 M HCl e esta solução foi incubada a 37°C por 1h, ou até a lise de todos os parasitas. Em seguida foram adicionados 80 µl de DMSO em todos os poços e a placa foi novamente incubada a 37°C, com agitação manual a cada 15 min até a solubilização completa dos cristais de formazan. A leitura foi efetuada a 550 nm em leitor de ELISA EL800 da Biotek.

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória para 50% dos parasitas) foram estimados a partir dos valores médios obtidos em triplicata técnica, conforme descrito acima, com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Foram selecionados para avaliações nos demais experimentos os compostos que obtiveram os maiores Índices de Seletividade (IS), calculados dividindo-se a concentração citotóxica obtida em células Vero ($CC_{50}/24h$) pela concentração ativa em formas epimastigotas ($CI_{50}/24h$).

3.6. ATIVIDADE CONTRA AMASTIGOTAS INTRACELULARES

Células Vero infectadas com amastigotas intracelulares (ver item 3.3) foram incubadas com diferentes concentrações (3,75 a 100 µM) dos compostos selecionados na triagem, em um volume final de 200 µl/poço. Como controles foram utilizados benzonidazol e DMSO a 1%. Após 24 horas as placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas por 30 minutos com Giemsa diluído em PBS pH 7,2.

Avaliação da atividade tripanocida realizou-se por contagem aleatória de 100 células hospedeiras por poço com auxílio do software ImageJ, a partir de imagens obtidas em microscópio invertido, avaliando-se o número de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares. Os valores foram expressos como percentual de inibição (PI), calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $PI = 100 - (T/C \times 100)$, onde T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas e C é a média do total de amastigotas intracelulares em células controle. Os valores de CI_{50} foram estimados a partir dos valores de PI obtidos em triplicata técnica, com os quais fez-se o cálculo da porcentagem relativa (ao controle) de inibição. Os valores de $CI_{50}/24h$ foram obtidos pelo software CompuSyn a partir dos dados de concentração-efeito.

3.7. ATIVIDADE CONTRA TRIPOMASTIGOTAS PROVENIENTES DE CULTIVO CELULAR

Tripomastigotas provenientes de cultivo celular foram lavados em PBS (3000g por 10 min) e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ com EPA-35 ou GIB-24 diluídos em diferentes concentrações (0,84375 a 100 µM) em DMEM + 10% SFB. Após esse período realizou-se contagem em câmara de Neubauer do número de tripomastigotas presentes e calculou-se a porcentagem de inibição dos poços tratados relativa aos não tratados (controle com 1% DMSO). Os dados de concentração-efeito foram analisados com software CompuSyn para cálculo da $CI_{50}/24h$ para estas formas evolutivas.

3.8. ATIVIDADE NO CICLO INTRACELULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Células Vero previamente semeadas em placas de 24 poços (1x10⁵ células por poço) foram infectadas com 1x10⁶ tripomastigotas provenientes de cultivo celular. Após quatro horas as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitas não interiorizados e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em 1 ml de DMEM + 10% SFB. Após 12 horas de infecção

adicionou-se EPA35 ou GIB24 em diferentes concentrações (EPA-35: 1,875 a 30- μ M; GIB-24: 5 a 13 μ M).

Após 72 horas os tripomastigotas e amastigotas liberados no sobrenadante foram coletados e contados em câmara de Neubauer para quantificação da porcentagem relativa de tripomastigotas e amastigotas liberados em culturas tratadas, em relação às não tratadas. A porcentagem de inibição do total de células contadas (tripomastigotas e amastigotas) relativa ao controle foi utilizada para o cálculo da $CI_{50}/72h$, usando-se o software CompuSyn. A razão entre porcentagem de amastigotas e tripomastigotas foi calculada com software Excel.

3.9. AFERIÇÃO DE PH DO MEIO APÓS TRATAMENTO COM GIB-24

Meio DMEM puro e também culturas de células Vero não infectadas ou infectadas com *T. cruzi* Dm28c em meio DMEM foram incubados com 5 a 13 μ M de GIB-24 em placas de 24 poços, para avaliar se GIB-24 promoveria alteração do pH do meio de cultura. As aferições de pH foram feitas após 48 horas de incubação em pHmetro ORION 520A-X. O experimento foi realizado em duplicata técnica. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

3.10. EFEITO COMBINADO COM BENZONIDAZOL (BZN)

Formas epimastigotas com três dias de cultivo foram suspensas em meio LIT, com concentração ajustada para 1×10^7 epimastigotas/ml. Foram semeados 180 μ l/poço dessa suspensão em placas de 96 poços, seguindo-se incubação com combinações das concentrações $CI_{50}/24h$, $\frac{1}{2} CI_{50}/24h$ e $\frac{1}{4} CI_{50}/24h$ de EPA-35 ou GIB-24 com as mesmas concentrações de BZN. Tais concentrações correspondem a (a) 33 μ M, 16,5 μ M e 8,25 μ M de EPA-35; (b) 6 μ M, 3 μ M e 1,5 μ M de GIB-24; (c) 15 μ M, 7,5 μ M, 3,75 μ M de BZN, respectivamente.

Como controle negativo utilizou-se o solubilizante DMSO a 1%. A atividade antiparasitária foi avaliada pela técnica do MTT, conforme descrito no item 3.3. Análise dos isobogramas das combinações de EPA-35/BZN e GIB-24/BZN foi feita com o software CompuSyn. Os resultados foram interpretados utilizando (a) o Índice de combinação (*Combination Index* = CI), uma medida quantitativa do grau de interação da droga em termos de sinergia e antagonismo para um determinado parâmetro de medição (Chou e Talalay, 1981), e (b) o índice de redução de dose (DRI), uma medida de quantas vezes a dose de cada composto pode ser reduzida em uma combinação sinérgica para se obter determinado grau de efeito (por

exemplo, 50%, 75%, 90% de inibição), quando comparado com doses de cada composto sozinho (Azeredo e Soares, 2013).

3.11. VIABILIDADE CELULAR E CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

3.11.1. Integridade de membrana plasmática

O iodeto de propídio (PI) é um corante não permeável a membrana plasmática de células vivas, utilizado para detectar células mortas numa população. Em células que possuam poros na membrana plasmática, o PI entra e liga-se ao DNA por intercalação entre as bases com pouca ou nenhuma sequência de preferência. Uma vez que o corante é ligado ao DNA a sua fluorescência é aumentada de 20 a 30 vezes (ThermoFischer, 2017).

Para avaliar a integridade de membrana, aproximadamente 1×10^6 epimastigotas previamente tratados 24 horas com a $CI_{50}/24h$ ou $2 \times CI_{50}/24h$ dos compostos selecionados foram centrifugados a 7000g por 1 min e lavados com 1 ml de PBS. Os parasitas foram então suspensos em PBS contendo 5 $\mu g/ml$ de iodeto de propídio (PI). Após 15 minutos a 28°C as células foram imediatamente quantificadas sem lavar. Parasitas foram considerados mortos quando marcados positivamente, utilizando-se um filtro de 585/42 nm. Como controle positivo foram utilizados epimastigotas permeabilizados com 0,125% de saponina, a qual foi adicionada a amostra após a marcação com PI. Foram coletados 20 mil eventos (SSC \times FSC visualização da população, *ungated*) em um citômetro FACSCanto II. Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo (Treestar).

3.11.2. Potencial de membrana mitocondrial

A rodamina 123 (Rhd) é um corante catiónico, verde-fluorescente, permeante às células, que é facilmente sequestrado por mitocôndrias ativas sem efeitos citotóxicos, fazendo com que todas as células que matêm o potencial de membrana mitocondrial fiquem fluorescentes. Células que tenham o potencial de membrana mitocondrial alterado, portanto, tendem a ter menor deposição do corante, ficando menos fluorescentes (Controle positivo) que células sem alterações fisiológicas (Controle negativo).

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, aproximadamente 1×10^6 epimastigotas previamente tratados 24 horas com a $CI_{50}/24h$ ou $2 \times CI_{50}/24h$ dos compostos selecionados foram centrifugados a 7000g por 1 min e lavados com 1 ml de PBS. Os parasitas foram então incubados por 15 min a 28°C com 10 $\mu g/ml$ de rodamina 123 (Rhd), lavados 3 vezes em PBS e quantificados usando-se o filtro de 530/30 nm. Foram coletados 20 mil eventos

(SSC × FSC visualização da população, *ungated*) em um citômetro FACSCanto II. Como controle foram utilizados epimastigotas tratados com 200 µM de carbonil cianeto m-clorofenil hidrazina (CCCP) após a marcação com Rhd. Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo (Treestar).

3.11.3. Lise celular e exposição de fosfatidilserina

Aproximadamente 1×10^6 epimastigotas previamente tratados 24 horas com concentrações próximas às $CI_{50}/24h$ ou $2xCI_{50}/24h$ de EPA-35 ou GIB-24 foram centrifugados a 7000g por 1 min e lavados em PBS. Apoptose foi avaliada por quantificação da exposição de fosfatidilserina com o kit BD PharMingen™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection, de acordo com instruções do fabricante (BD).

As células foram lavadas em PBS e coradas por 30 min a 28°C com anexina-V-FITC, que se liga à fosfatidilserina exposta na membrana celular de células apoptóticas ou necróticas. Em seguida as células foram coradas por 15 min a 28°C com iodeto de propídio (IP), que se liga ao DNA de células cuja membrana encontra-se descontínua, como ocorre em células em lise por morte necrótica. Em todas as análises foram coletados 20 mil eventos no *gate* correspondente a epimastigotas [tamanho e granulosidade das células (FSC x SSC scatter)]. A marcação por Anexina-V foi observada com o filtro de 530/30 nm e a marcação com IP com filtro de 585/42 nm, em um citômetro FACSCanto II. Células não coradas e coradas apenas com um dos marcadores foram usadas para fazer a compensação do sinal dos detectores. Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo (Treestar).

3.11.4. Ciclo celular

Cerca de 1×10^6 epimastigotas previamente tratados por 3 ou 24 horas com a $CI_{50}/24h$ ou $2xCI_{50}/24h$ dos compostos selecionados foram centrifugados a 7000g por 1 min e lavados em PBS. Após lavagem as células foram suspensas em 1 ml de solução de coloração de DNA contendo 3,4 mM Tris-HCl, 0,075 mM Iodeto de Propídio, 0,1% NP40, 10 mM NaCl e 700 U/L Rnase A (Di Paola et al., 2010). As células foram mantidas em gelo até quantificação no citômetro. Para as análises foram coletados 20 mil eventos no *gate* correspondente a epimastigotas [tamanho e granulosidade das células (FSC x SSC scatter)] em um citômetro FACSCanto II. As análises foram realizadas em porta de epimastigotas simples (FSC-W × FSC-H), para exclusão de *doublets* utilizando-se o software FlowJo (Treestar).

3.12. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Após tratamento com CI_{50} e com $2xCI_{50}$ de EPA-35 ou GIB-24 formas epimastigotas foram recolhidas e lavadas em PBS pH 7,2 por centrifugação por 1 min a 9300g. As células foram fixadas por 40 minutos em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, lavadas em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 e aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina a 0,1%. Seguiu-se pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 10 minutos, desidratação em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e secagem pelo ponto crítico. As lamínulas foram aderidas em suportes para MEV e recobertas com uma camada de 20 nm de ouro. O material foi observado em MEV Jeol JSM 6010PLUS-LA.

3.13. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Após tratamento com a CI_{50} e $2xCI_{50}$ de EPA-35 ou GIB-24 formas epimastigotas foram recolhidas e lavadas em PBS pH 7,2 por centrifugação por 1 min a 9300g. AS células foram fixadas por 40 minutos em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, lavados 2 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e pós-fixadas por 10 minutos em tetróxido de ósmio a 1%. Após lavagem no mesmo tampão as células foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), infiltradas durante a noite em uma mistura de acetona-PolyBed 812 (1:1) e embebidas por 72h a 60°C em resina PolyBed-812 pura (PolySciences, Warrington, PA, EUA). Cortes ultra-finos (70 nm de espessura) foram coletados em grades de cobre de 300 mesh e corados por 30 min no escuro com 5% de acetato de uranila e por 2 min com citrato de chumbo. Os cortes foram observados com microscópio JEOL JEM-1400Plus.

3.14. ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DE PARASITAS RESISTENTES A GIB-24

3.14.1. Seleção de epimastigotas resistentes a GIB-24

Epimastigotas foram selecionados em meio LIT contendo concentrações crescentes de GIB-24 (3 a 15 μ M). Os repiques foram realizados a cada 4 ou 5 dias de cultivo e o aumento de dosagem foi feito a cada 15 dias, até alcançar 15 μ M de GIB-24. Tal seleção ocorreu em duplicata biológica. Os parasitas foram mantidos nesta concentração por 5 meses e então foi

realizada curva de crescimento com ambas as réplicas biológicas, além de avaliação por citometria de fluxo da integridade de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial.

3.14.2. Curva de crescimento de epimastigotas resistentes a GIB-24

Ambas as réplicas biológicas de epimastigotas resistentes a 15 μM de GIB-24 (já selecionadas) foram incubadas em concentração inicial de 1×10^6 epimastigotas/ml e acompanhadas até o oitavo dia de crescimento, com contagens em câmara de Neubauer a cada 24 horas. O mesmo foi realizado para duas réplicas de epimastigotas selvagens (controle).

3.14.3. Integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial

Epimastigotas tratados com 15 μM de GIB-24 foram avaliadas por citometria de fluxo como descrito acima (integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial; itens 3.11.1 e 3.11.2, respectivamente). Como controles foram utilizados epimastigotas selvagens e epimastigotas selvagens tratados com 15 μM GIB-24. Todas as culturas foram avaliadas após 3 dias de crescimento.

3.14.4. Protocolo FASP (Filter-Aided Sample Preparation)

As duas réplicas biológicas de epimastigotas selvagens e as duas réplicas biológicas de epimastigotas resistentes a 15 μM de GIB-24 foram cultivadas por 3 dias. Em seguida, 3×10^8 células foram centrifugadas a 5.000g por 5 min e lavadas 2 vezes com PBS. Foram adicionados 240 μL de tampão de lise (4% SDS, 100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 7,5), misturando com micropipeta até completa dissolução do pellet. Em seguida agitou-se em vortex por 30 segundos e as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 minutos. Deixou-se em banho sonicador por 1h para quebrar o DNA e não apresentar mais viscosidade, e em seguida se centrifugou a 20.000g por 5 min a 20°C, separando-se o sobrenadante em um tubo limpo e descartando-se o pellet. O extrato foi armazenado a -70°C até processamento.

As amostras foram descongeladas e processadas para os ensaios segundo o protocolo FASP descrito a seguir (Wisniewski et al., 2009). Inicialmente cada amostra foi acondicionada em um Amicon Ultra-15 10K (Millipore), sendo cerca de 5 mg de proteína em cada filtro. Foi adicionada uma solução de UA (8 M Uréia em 100 mM Tris-HCl pH, 8,8) + 10 mM ditiotretitol (DTT; 6,7x o volume do lisado) em cada Amicon. As amostras foram homogeneizadas com

pipeta e centrifugadas a 4.000g 30 minutos a 20°C, sendo essa etapa repetida por mais três vezes. Em seguida as amostras foram alquiladas com 50 mM Iodacetamida (IAA) em UA (3,3x o volume do lisado), homogeneizadas sob agitação por 1 minuto a aproximadamente 600 rpm, incubadas no escuro por 20 minutos e centrifugadas a 4.000g por 40 minutos a 20°C. Na sequência foram realizadas duas etapas de lavagem com UA (3,3x o volume do lisado), seguindo-se duas etapas de lavagem com 50 mM Bicarbonato de amônia (ABC) (3,3x volume do lisado), sendo que a cada lavagem as amostras foram homogeneizadas com pipeta e centrifugadas a 4.000g por 30 minutos.

Os extratos foram dosados por Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Em seguida foi adicionada tripsina na proporção 1 µg de tripsina : 100 µg de proteína, e solução ABC, e incubou-se por 18 horas a 37° C. Após este período foi realizada a troca do reservatório para armazenagem dos peptídeos que foram digeridos no filtro e a eluição dos peptídeos digeridos com ABC (3,3x o volume do lisado), seguindo-se homogeneização e centrifugação a 4.000g por 40 minutos a 20°C. As amostras foram resuspensas em 0,5M NaCl (1,5x o volume do lisado), seguindo-se homogeneização e centrifugação a 4.000g por 40 minutos a 20°C. Por fim, os peptídeos foram dosados a 280 nm no NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) e acidificados com 0,5% TFA.

3.14.5. Fracionamento dos peptídeos

Após a digestão das proteínas, as amostras peptídicas foram fracionadas através de cromatografia líquida de fase reversa (FR) básica. Foi utilizada uma coluna Sep Pack C18 130 mg para cada réplica de cada concentração. As colunas foram ativadas com 5 ml de metanol e equilibradas com 5 ml de 20 mM Formiato de amônio (FA; Formiato de Amônio 200 mM: 0,8% Hidróxido de Amônio, 0,16% Ácido Fórmico). O volume das amostras peptídicas que passou pela coluna foi de 10 ml para cada amostra. Cada coluna foi lavada 2x com 5 ml de 20 mM FA.

Foram realizadas eluições com diferentes concentrações de Acetonitrila (ACN), em diferentes frascos. No primeiro frasco os peptídeos foram eluídos da coluna com 1 ml de 10% ACN / 20 mM FA. Em um segundo frasco, com 1 ml de 14% ACN / 20 mM FA. Em um terceiro frasco, com 1 ml de 18% ACN / 20 mM FA. Por fim, no último frasco com 1 ml de 60% ACN / 20 mM FA. Os eluídos foram dosados por Qubit, todas as frações foram secas em Speed Vac (~10 horas) e armazenadas em Stage-tips.

3.14.6. Stage-tips

Os Stage-tips são utilizados para purificação e armazenamento dos peptídeos. Foram fabricados através da inserção de uma porção de membrana C18 em uma ponteira P200.

Inicialmente o Stage-tip foi acoplado a um adaptador de centrífuga com um reservatório. A membrana C18 foi ativada com 100 µl de metanol, centrifugada 1.000g por 2 minutos e equilibrada com 200 µl de solução A e então centrifugada a 1000g por 6 minutos. Os peptídeos secos no Speed-Vac foram ressuspensos em 1 ml de solução A (ácido trifluoracético 1% em água). Em seguida a amostra passou pela membrana C18 através de centrifugação a 1.000g, pelo tempo necessário até que toda a amostra passasse pela membrana. Foram adicionados 10 µg de peptídeo por Stage-tip. Por fim, os Stage-tips foram lavados 2 vezes com 200 µl de solução A e centrifugados a 1000g por 6 minutos. Foram então armazenados a 4°C até o momento da eluição.

Para a eluição dos peptídeos cada Stage-tip foi lavado com 200 µl de solução A e centrifugado a 1.000g por 6 minutos. Em um tubo novo os peptídeos foram eluídos 2 vezes com 20 µl da solução B (ácido trifluoracético 1% em 80% Acetonitrila). A acetonitrila foi retirada através de secagem em Speed-Vac (aproximadamente 30 minutos, sem aquecimento). Então, os peptídeos foram ressuspensos em 12,5 µl de solução A* (5% Acetonitrila, 1% ácido trifluoracético, 5% DMSO) para injeção no cromatógrafo, onde foram separados e entraram no espectrômetro de massas para serem analisados.

3.14.7. Análise por Nano LC-MS/MS

As amostras foram analisadas em duplicata técnica através da injeção de 4 µg de peptídeos por corrida. As misturas peptídicas foram separadas por nanocromatografia líquida de fase reversa e analisadas por nano ESI MS/MS. Os experimentos foram realizados com um cromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de ionização Phoenix ST. A separação dos peptídeos ocorreu com um fluxo de 250 nl/min em fase móvel com acetonitrila (ACN) / 0,1% ácido fórmico / 5% DMSO. Utilizou-se um gradiente linear de 5 a 40% de ACN em 120 minutos. A cromatografia ocorreu em coluna analítica de sílica de 30 cm, com diâmetro interno de 75 µm e partículas de C18 (Dr. Maisch) com diâmetro de 1,9 µm aquecida a 60°C. Os peptídeos foram ionizados por nano eletro spray (voltagem de 2,7 kV) e injetados no MS. O modo de aquisição foi por *Data Dependent Analysis* (DDA) como segue: *scan* inicial no

Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID e analisados no *ion trap*.

Paralelamente ao MS/MS foi realizado um *full scan* no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons para MS2 foi usada uma lista de exclusão dinâmica de 90 segundos. A opção *lock mass* foi utilizada para obtenção de melhor acurácia - erro abaixo de 0,5 p.p.m. - de massa dos peptídeos trípticos precursores detectados por MS.

3.14.8. Análise dos dados de proteômica

Os arquivos gerados (.raw) foram analisados no algoritmo MaxQuant versão 1.5.5.1. As buscas foram feitas contra um banco de dados de sequências proteicas de *Trypanosoma cruzi* acrescido de contaminantes comuns, tais como queratinas e tripsina. Em conjunto foi utilizado um banco de dados composto do reverso das sequências utilizadas na busca. Nos parâmetros de busca foi permitido até 20 ppm (primeira busca) e 4,5 ppm (busca principal) de tolerância nos espectros de MS1 e de 0,5 Da nos espectros de MS2. A análise foi específica para peptídeos trípticos, permitindo-se até dois *missed cleavages* e peptídeos com tamanho mínimo de 7 resíduos de aminoácidos. Os parâmetros usados foram os parâmetros padrão do MaxQuant, como segue: *Fixed modifications* - Carbamidomethyl (C); *Variable modifications* - Acetyl (Protein N-term); *Oxidation* (M). O banco de dados usado foi de *Trypanosoma cruzi* CL Brener com 19.242 entradas, baixado em 10/08/2016 do Uniprot. A ferramenta de LFQ foi usada para quantificação das proteínas e a opção *match between runs* foi usada para aumentar as identificações através da comparação de espectros entre as corridas.

As proteínas identificadas foram analisadas utilizando o software Perseus. Filtrou-se da lista inicial as identificações de proteínas classificadas como apenas identificadas por local, Contaminantes e *Reverse*, as quais foram excluídas da estrutura de dados. Em seguida, os dados restantes foram transformados para escala Log2 para dar continuidade as análises (LNBio,2014). Após, a análise foi realizada em duas abordagens:

- 1) Realizou-se a análise estatística dos dados utilizando o teste T de Student com valor $p = 0,05$ para avaliação de diferenças em quantidade de proteínas (*LFQ intensity* = intensidade LFQ) entre amostras Controle (epimastigotas não tratados) e amostras resistentes a 15 μM de GIB-24. Dentre as proteínas com diferença estatística foram analisadas aquelas que tiveram diferença quantitativa (GIB24 – Controle em escala Log2) $\geq +1$ ou ≤ -1 .
- 2) Os dados foram divididos em dois grupos, Controle e Resistentes a 15 μM de GIB-24 e se filtrou apenas aquelas proteínas que foram encontradas em um grupo e ausentes no outro (encontradas no Controle e ausentes nas resistentes a GIB-24, ou vice-versa). Foram

consideradas para análise apenas aquelas proteínas que obtiveram intensidade LFQ próxima a 24, valor médio da intensidade encontrada em todas as proteínas nesta identificação. Amostras próximas a essa média são mais confiáveis como corretamente identificadas pois valores baixos de LFQ representam proteínas pouco abundantes que podem não ser detectadas em todas as corridas. Logo, utilizando apenas aquelas proteínas que tiveram intensidade LFQ próximos a média de todas as proteínas, a diferença observada deve-se a diferença de expressão e não diferença na detecção.

Para todas as proteínas selecionadas, realizou-se uma busca por enriquecimento de classes/termos do *Gene Ontology Consortium*, utilizando o TriTrypDB. O projeto *Gene Ontology (GO)* fornece vocabulários controlados de termos definidos que representam as propriedades dos produtos genéticos. Estes abrangem três domínios: Componente Celular (GOCC), as partes de uma célula ou o seu ambiente extracelular; Função Molecular (GOMF), as atividades elementares de um produto gênico a nível molecular, tal como ligação ou catálise; e Processos Biológicos (GOBP), operações ou conjuntos de eventos moleculares com um começo e fim definidos, pertinentes ao funcionamento de unidades de vida integradas: células, tecidos, órgãos e organismos.

Realizou-se a busca nas plataformas TriTrypDB e no Pfam com as proteínas com diferença de intensidade média $\geq +1$ ou ≥ -1 (em Log2), e com aquelas presentes em somente um grupo (controle ou GIB-24) a fim de se avaliar suas possíveis funções biológicas a partir da identificação de domínios funcionais.

4. RESULTADOS

4.1. TRIAGEM DE COMPOSTOS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

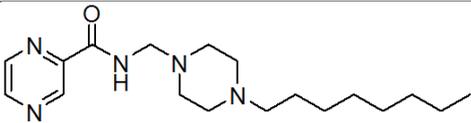
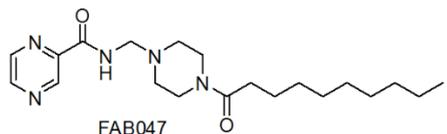
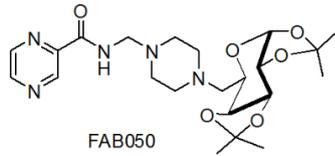
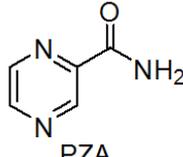
4.1.1. Compostos sem atividade seletiva

Triagem de 75 compostos após 24 horas de tratamento em formas epimastigotas de *T. cruzi* demonstrou que a maioria dos compostos não teve atividade e vários tiveram atividade pouco seletiva, sendo muito citotóxicos em células Vero. Dentre os compostos com este perfil encontram-se:

- a) 4 bases de Mannich derivadas de pirazinamida (Tabela 4.1);
- b) 8 derivados pirazolínicos obtidos a partir de chalconas (Tabela 4.2);
- c) 10 derivados antraquinônicos (cadeias laterais: éteres/organohalogenados, amino-alcoois ou diaminas) com estrutura análoga a mitoxantrona (Tabela 4.3);
- d) 18 1,3,4-oxadiazóis obtidos a partir de reações de N-acilidrazonas em reação com anidrido acético (Tabela 4.4);
- e) 12 complexos de rutênio mercaptotiazolínicos (Tabelas 4.5 e 4.6);
- f) os constituintes de óleo essencial cinamaldeído e nerolidol (objetivo inicial da tese), os quais não foram ativos em concentrações até 300 μ M. A falta de atividade de cinamaldeído foi publicada em Azeredo et al. (2014) (ANEXO 1).

Todos estes 54 compostos não foram selecionados para dar continuidade nas avaliações em formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Tabela 4.1. Bases de Mannich derivadas da pirazinamida avaliadas contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

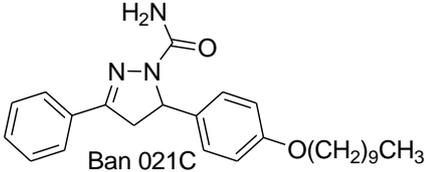
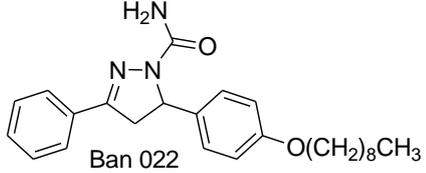
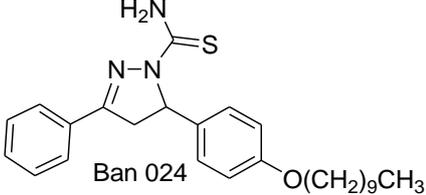
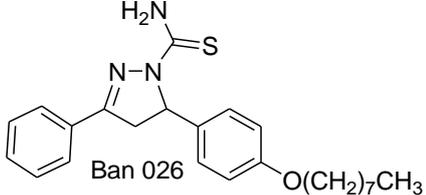
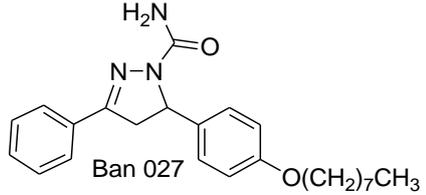
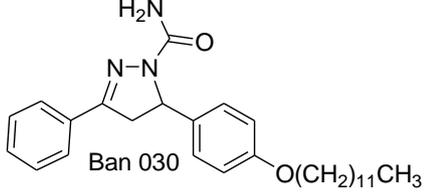
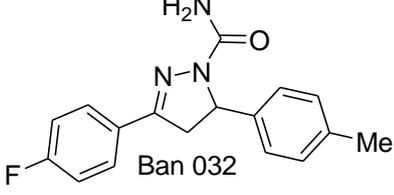
Composto	CI ₅₀ epimastigotas (μM)	CC ₅₀ Vero (μM)	IS	Estrutura
1 FAB 40	SA	ND	ND	 <p>FAB 040</p>
2 FAB 47	SA	ND	ND	 <p>FAB047</p>
3 FAB 50	SA	ND	ND	 <p>FAB050</p>
4 PZA	SA	ND	ND	 <p>PZA</p>

CI₅₀/24h (Concentração Inibitória para 50% dos epimastigotas após 24h de tratamento);

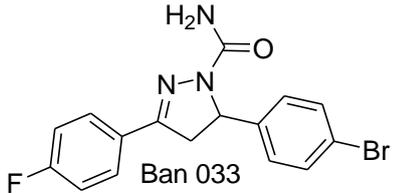
CC₅₀/24h (Concentração citotóxica para 50% das células Vero após 24h de tratamento);

IS (Índice de Seletividade (CC₅₀/CI₅₀); SA: Sem atividade até 100 μM; ND: Não determinado.

Tabela 4.2. Derivados pirazolínicos obtidos a partir de chalconas avaliados contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Composto	CI ₅₀ epimastigotas (μM)	CC ₅₀ Vero (μM)	IS	Estrutura
1 BAN 21 C	51,19	<50	1,0	 Ban 021C
2 BAN 22	59,04	ND	ND	 Ban 022
3 BAN 24	SA	ND	0,5	 Ban 024
4 BAN 26	SA	ND	ND	 Ban 026
5 BAN 27	46,02	<25	0,5	 Ban 027
6 BAN 30	SA	ND	ND	 Ban 030
7 BAN 32	SA	ND	ND	 Ban 032

Continuação da tabela 4.2.

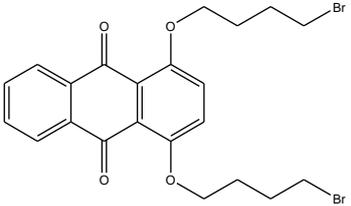
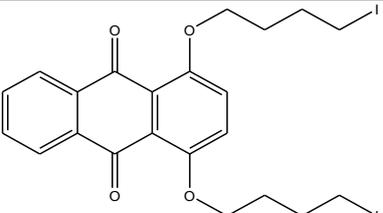
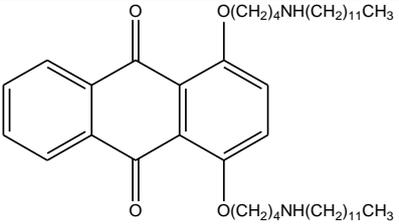
8	BAN 33	81,34	<50	0,6	
---	--------	-------	-----	-----	------------------------------------------------------------------------------------

CI₅₀/24h (Concentração Inibitória para 50% dos epimastigotas após 24h de tratamento);

CC₅₀/24h (Concentração citotóxica para 50% das células Vero após 24h de tratamento);

IS = Índice de Seletividade (CC₅₀/CI₅₀); SA: Sem atividade até 100 µM; ND: Não determinado.

Tabela 4.3. Derivados antraquinônicos (com cadeias laterais: diaminas éteres / organo-halogenados ou amino-alcoois) com estrutura análoga a mitoxantrona avaliados contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

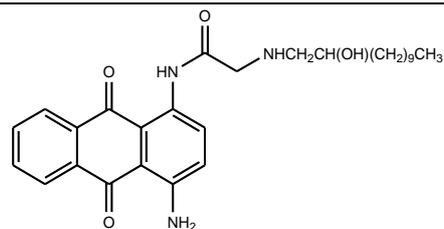
Composto	CI ₅₀ epimastigotas (µM)	CC ₅₀ Vero (µM)	IS	Estrutura
1 TAC 01	SA	ND	ND	
2 TAC 02	SA	ND	ND	
3 TAC 06A	SA	ND	ND	

Continuação da tabela 4.3.

4	TAC 10	SA	ND	ND	
5	TAC 12	SA	ND	ND	
6	TAC 13	SA	ND	ND	
7	LSF 31	SA	ND	ND	
8	LSF 32	SA	ND	ND	
9	LSF 33	SA	ND	ND	

Continuação da tabela 4.3.

10 LSF 35 SA ND ND



CI₅₀/24h (Concentração Inibitória para 50% dos epimastigotas após 24h de tratamento);

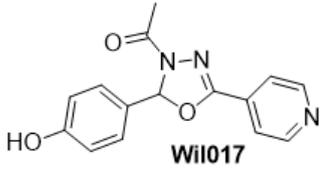
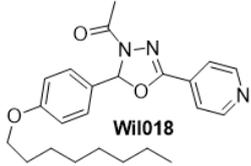
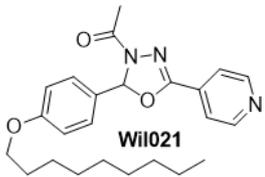
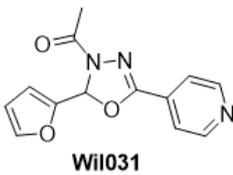
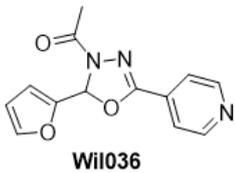
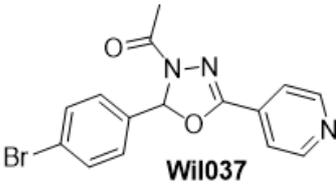
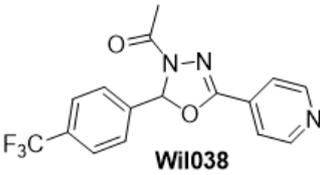
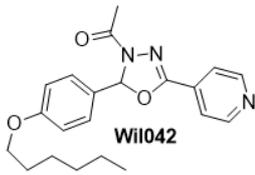
CC₅₀/24h (Concentração citotóxica para 50% das células Vero após 24h de tratamento);

IS = Índice de Seletividade (CC₅₀/CI₅₀); SA: Sem atividade até 100 µM; ND: Não determinado.

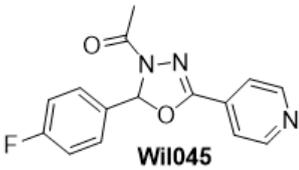
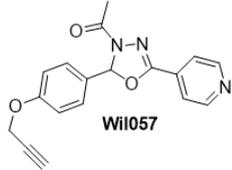
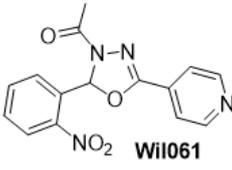
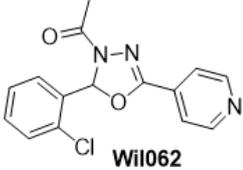
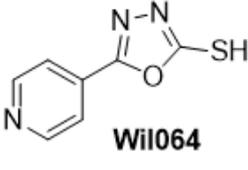
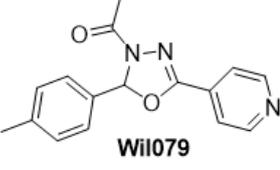
Tabela 4.4. 1,3,4-oxadiazóis obtidos a partir de reações de N-acilidrazonas em reação com anidrido acético avaliados contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

	Composto	CI ₅₀ epimastigota (µM)	CC ₅₀ Vero (µM)	IS	Estrutura
1	Wil 02	SA	ND	ND	<p>Wil002</p>
2	Wil 04	SA	ND	ND	<p>Wil004</p>
3	Wil 08	SA	ND	ND	<p>Wil008</p>
4	Wil 12	SA	ND	ND	<p>Wil012</p>

Continuação da tabela 4.4.

5	Wil 17	SA	ND	ND	
6	Wil 18	72,32	<31,12	0,4	
7	Wil 21	68,7	<31,12	0,45	
8	Wil 31	SA	ND	ND	
9	Wil 36	SA	ND	ND	
10	Wil 37	SA	ND	ND	
11	Wil 38	SA	ND	ND	
12	Wil 42	SA	ND	ND	

Continuação da Tabela 4.4.

13	Wil 45	SA	ND	ND	
14	Wil 57	SA	ND	ND	
15	Wil 61	SA	ND	ND	
16	Wil 62	SA	ND	ND	
17	Wil 64	SA	ND	ND	
18	Wil 79	SA	ND	ND	

CI₅₀/24h (Concentração Inibitória para 50% dos epimastigotas após 24h de tratamento);

CC₅₀/24h (Concentração citotóxica para 50% das células Vero após 24h de tratamento);

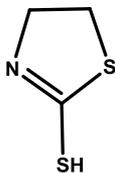
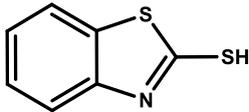
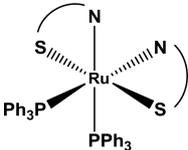
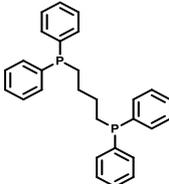
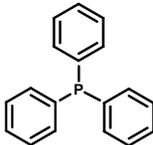
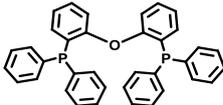
IS = Índice de seletividade (CC₅₀/CI₅₀); SA: Sem atividade até 100 µM; ND: Não determinado.

Tabela 4.5. Complexos de Rutênio avaliados contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

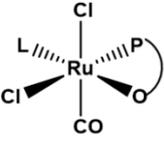
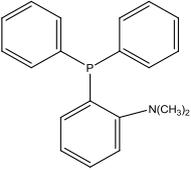
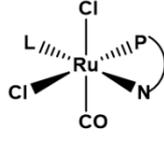
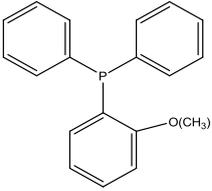
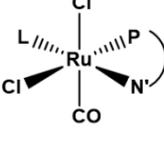
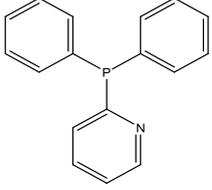
	Composto	Código	CI₅₀
1	Ru(mctz) ₂ (PPh ₃) ₂]	A1	SA
2	Ru(mcbtz) ₂ (PPh ₃) ₂]	A2	SA
3	RuCl(CO)(mctz)(PPh ₃) ₂	A3	SA
4	RuCl(CO)(mcbtz)(PPh ₃) ₂	A4	SA
5	Ru(mctz) ₂ (dppb)	A5	SA
6	Ru(mcbtz) ₂ (dppb)	A6	SA
7	PPh ₃ PN	B1	SA
8	PPh ₃ P-O	B2	SA
9	Ptol PN	B3	SA
10	Ptol PO	B4	SA
11	PPh ₃ PN'	B5	SA
12	Ptol PN'	B6	SA

SA: Sem atividade até 100 μM

Tabela 4.6 Estrutura dos complexos de Rutênio avaliadas.

Complexos	Estrutura básica	Ligantes
		 <p data-bbox="930 566 1295 600">Mctz = 2-Mercaptotiazolina</p>
		 <p data-bbox="890 797 1334 831">mcbtz = 2-mercaptobenzotiazolina</p>
<p data-bbox="339 909 408 943">1 a 6</p>	 <p data-bbox="571 981 823 1014">[Ru(mctz)₂(PPh₃)₂]</p>	 <p data-bbox="914 1066 1310 1133">dppb = 1,4-bis (difenilfosfina) butano</p>
		 <p data-bbox="967 1330 1257 1364">PPh₃ = Trifenilfosfina</p>
		 <p data-bbox="903 1480 1321 1547">DPEphos = Oxidi-(2,1 fenileno) bis (difenilfosfina)</p>

Continuação da tabela 4.6.

Complexos	Estrutura básica	Ligantes
7 a 12		 o-(difenilfosfina)-N,N-dimetilanilina P-N
		 o-difenilfosfina anisol P-O
		 2-(difenilfosfina)piridina P-N'
	L =PPh ₃ (Série 1) ou L= tri-p-toluilfosfina (Série 2)	

4.1.2. Compostos com atividade seletiva em epimastigotas de *T. cruzi*

Dos 75 compostos avaliados, apenas 4 mostraram atividade em formas epimastigotas de *T. cruzi*, com alguma seletividade. Dentre eles encontramos 3 diaminas (GSC-01, GIB-24 e CGE) e uma azlactona (EPA-35). Portanto, estes grupos de compostos (azlactonas e diaminas) serão descritos a seguir nesta tese, sendo os compostos mais ativos selecionados para avaliações em maior profundidade.

4.1.2.1 Azlactonas (Anexo 2)

4.1.2.1.1. Triagem em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Quatro azlactonas foram avaliadas em formas epimastigotas de *T. cruzi*: EPA-27, EPA-35, EPA-63 e EPA-91 (Figura 4.1). Após tratamento durante 24 horas o composto mais ativo foi EPA-35 (Tabela 4.7), com IS = 6,74. Os outros três compostos (EPA-27, EPA-63 e EPA-91) não foram eficazes em concentrações até 100 μM . Por outro lado, benzonidazol (BZN) teve IS de 223,68 ($\text{CI}_{50}/24\text{h} = 12,16 \mu\text{M}$; $\text{CC}_{50}/24\text{h} = 2720 \mu\text{M}$).

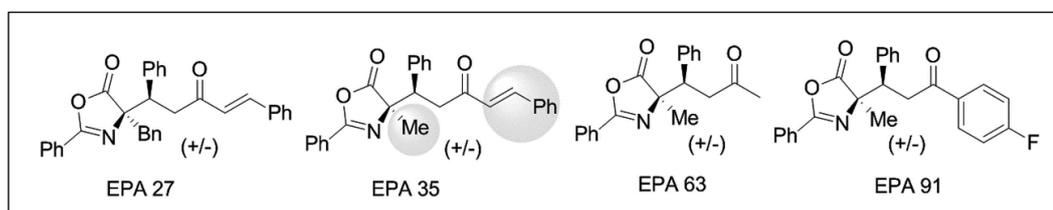


Figura 4.1. Estrutura química dos quatro derivados de azlactona avaliados nesta tese.

4.1.2.1.2. Atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares

EPA-35 foi o composto mais eficiente contra epimastigotas de *T. cruzi* e por isso foi também avaliado contra amastigotas intracelulares, *in vitro*. Contra as amastigotas o EPA-35 foi cerca de 14x mais potente, em comparação com sua atividade nos epimastigotas (Tabela 4.7), com IS = 95,04. O medicamento de referência BZN teve SI = 396,5 ($\text{CI}_{50}/24\text{h} = 6,86 \mu\text{M}$; $\text{CC}_{50}/24\text{h} = 2720 \mu\text{M}$), apenas 4,17 vezes mais seletivo do que EPA-35.

Tabela 4.7. Atividade de EPA-35 e benzonidazol (BZN) em epimastiotas (Epi) e amastigotas intracelulares (Ama) de *T. cruzi* e citotoxicidade em células Vero.

	$\text{CI}_{50}/24\text{h}$ Epi (μM)	$\text{CI}_{50}/24\text{h}$ Ama (μM)	$\text{CC}_{50}/24\text{h}$ Vero (μM)	IS Epi	IS Ama
EPA-35	33	2,34	222,4	6,74	95,04
BZN	12,16	6,86	2720	223,68	396,50

Índice de Seletividade (IS) = $\text{CC}_{50}/24\text{h} / \text{CI}_{50}/24\text{h}$

4.1.2.1.3. Quantificação de epimastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas

Epimastigotas tratados com 15, 30 e 50 μM de EPA-35 foram contados em câmara de Neubauer após 24 de tratamento para confirmar se de fato ocorre diminuição de células devido a morte por inviabilidade da mitocôndria, indicada pelo método colorimétrico do MTT utilizado na triagem de atividade dos compostos. Foi possível observar que nas concentrações de 30 e 50 μM houve redução significativa da quantidade de células em relação ao controle (Fig. 4.2).

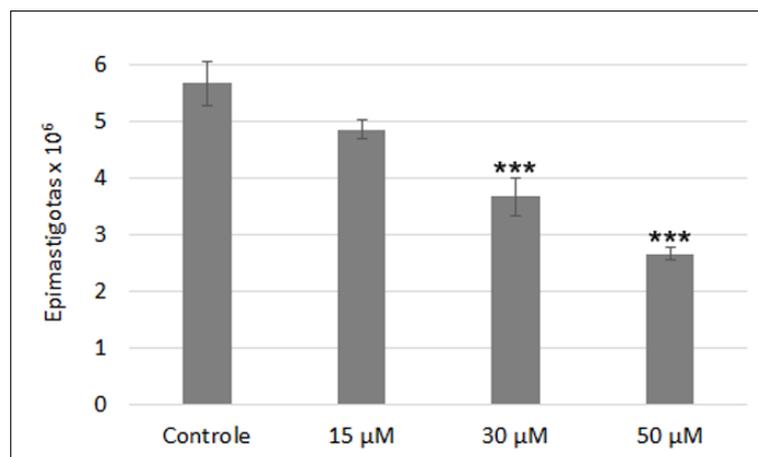


Figura 4.2. Quantificação de epimastigotas tratados com EPA-35 após 24 horas.

*** $p < 0,0001$

4.1.2.1.4. Atividade da combinação EPA-35+benzonidazol em epimastigotas de *T. cruzi*

A fim de avaliar se EPA-35 potencializaria a atividade de benzonidazol (BZN), fármaco referência no tratamento de doença de Chagas, e vice-versa, fizeram-se diferentes combinações das concentrações 33 μM , 16,5 μM e 8,25 μM de EPA-35 com 15 μM , 7,5 μM e 3,75 μM de BZN.

A partir dos dados de inibição de crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, foram obtidas curvas concentração-efeito (Fig. 4.3A) e o isoblograma (Fig. 4.3B) utilizando-se o software CompuSyn, para avaliação da existência de sinergia, antagonismo ou indiferença na combinação dos compostos. O isoblograma (com valores de 0 a 2) mostra relações de antagonismo ou sinergia quando dois ou mais compostos são usados em combinação. Assim, valores com CI (*Combination Index*) abaixo de 1 significam sinergia, acima de 1 significam antagonismo e próximos a 1 significam indiferença (Chou e Talalay, 1981; Azeredo e Soares, 2013).

Na combinação EPA-35 + BZN se observou efeito sinérgico somente na combinação de concentrações próximas a $CI_{50}/24h$ de cada composto (33 μM de EPA-35 + 15 μM de BZN), ficando todas as outras combinações (maioria dos pontos experimentais) com valores maiores a 1, indicando que de maneira geral há uma relação antagônica no uso combinado destes dois compostos (Tabela 4.8).

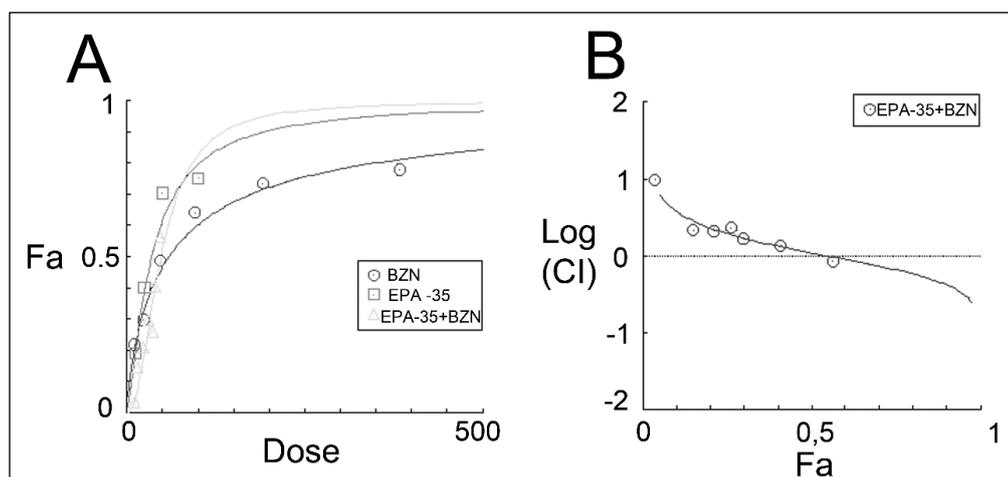


Figura 4.3. Efeito da combinação EPA35 + Benzonidazol (BZN) contra epimastigotas de *T. cruzi*. **A.** Curva concentração-efeito dos compostos isolados, e da combinação EPA-35 + BZN. **B.** Isobolograma mostrando os *Combination Index* (CI) para as combinações de EPA-35 + BZN. Gráficos obtidos com o software CompuSyn.

Tabela 4.8. Valores CI para cada ponto experimental da combinação EPA-35 + Benzonidazol (BZN).

Dose Total EPA-35 (E) +BZN (B) em μM	Efeito (Fa)	CI
33 E + 15 B	0,5638	0,86646
33 E + 7,5 B	0,406	1,35190
33 E + 3,75 B	0,2614	2,37578
16,5 E + 15 B	0,2984	1,68860
16,5 E + 7,5 B	0,2079	2,11358
8,25 E + 7,5 B	0,1463	2,17634
8,25 E + 3,75 B	0,0334	9,88965

4.1.2.1.5. Atividade de EPA-35 em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

O tratamento de tripomastigotas provenientes de cultivo celular com EPA-35 por 4 horas não levou à lise ou a qualquer alteração na proporção amastigotas/tripomastigotas, ficando as culturas tratadas semelhantes a cultura controle.

4.1.2.1.6. Atividade no ciclo intracelular de *T. cruzi*

Células Vero infectadas foram submetidas ao tratamento com EPA-35 (até 30 μM) e a infecção foi acompanhada até a liberação de tripomastigotas no sobrenadante das células de controle não tratadas (72h). Os parasitas completaram o ciclo intracelular em infecções tratadas, com liberação de tripomastigotas e amastigotas no sobrenadante, mas houve uma diminuição dose-dependente na contagem média de parasitas liberados (tripomastigotas + amastigotas, Fig. 4.4A). Entretanto, a relação % amastigotas/% tripomastigotas permaneceu constante (Fig. 4.4B), indicando que o processo de diferenciação não foi afetado.

Avaliação de citotoxicidade em células Vero não infectadas tratadas por 72 horas com EPA-35 resultou num valor de $\text{CC}_{50}/72\text{h}$ de 404,6 μM , enquanto BZN não induziu citotoxicidade em concentrações de até 3842,70 μM . Assim, a diminuição dose-dependente na contagem média de parasitas não pode ser atribuída à citotoxicidade em células hospedeiras.

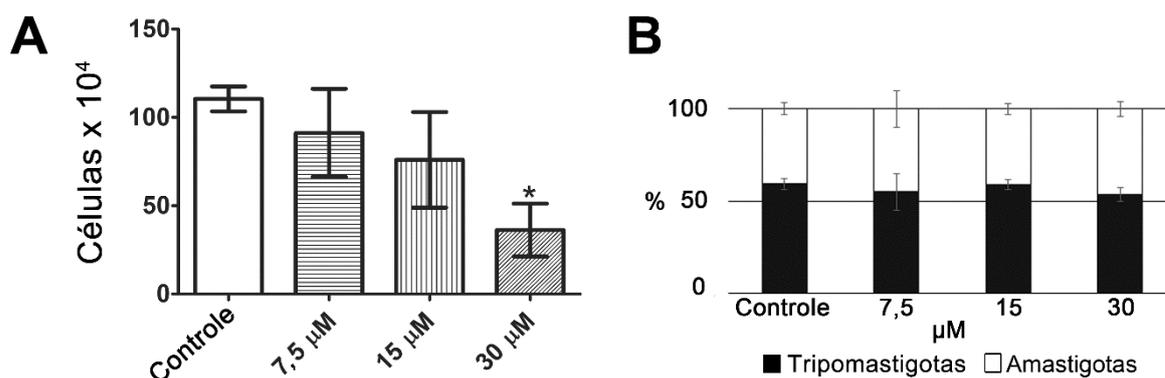


Figura 4.4. Efeito de EPA-35 no ciclo intracelular de amastigotas de *T. cruzi* após incubação durante 72h. **A.** Número médio de parasitas libertados (amastigotas + tripomastigotas) no sobrenadante de culturas de células Vero infectadas tratadas e não tratadas (Controle); **B.** Porcentagem relativa de tripomastigotas e amastigotas liberados no

sobrenadante de culturas de células Vero infectadas tratadas e não tratadas.
*Significativamente diferente das infecções não tratadas ($p < 0,05$).

4.1.2.1.7. Alteração de tamanho celular de epimastigotas tratadas com EPA-35

Análises por citometria de fluxo quanto ao tamanho (FSC-A) de epimastigotas tratados com EPA-35 mostraram que em tratamento com 30 μM ou 50 μM ocorreu um aumento significativo na porcentagem de células consideradas pequenas, este aumento sendo de cerca de 8 vezes no número de células consideradas pequenas (Tabela 4.9), quando comparadas a epimastigotas não tratados (Fig. 4.5, Tabela 4.9).

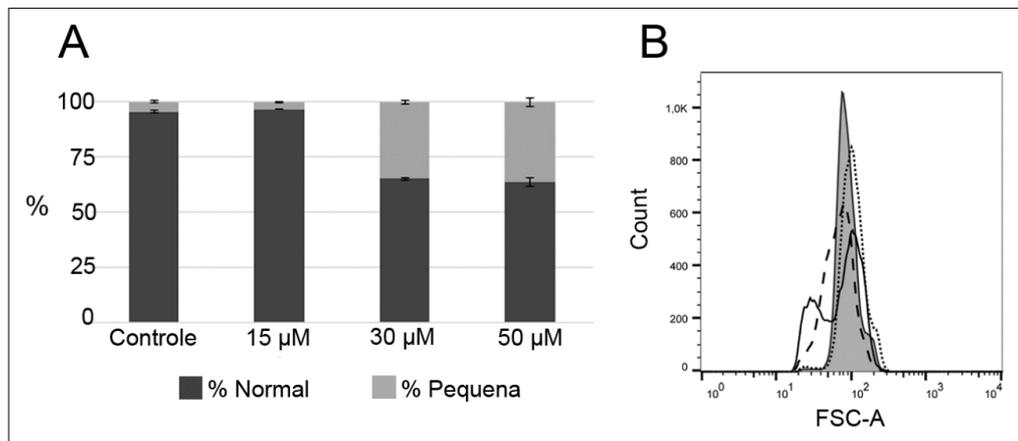


Figura 4.5. Tratamento com EPA-35 afeta o tamanho de epimastigotas, de forma dose-dependente. A: Porcentagem de células com tamanho considerado normal ou pequenas, em relação ao tamanho de células controle (não tratadas). Média e desvio padrão de três experimentos representativos. **B:** Histograma representativo da distribuição do tamanho celular após tratamento com EPA-35. Cinza: Controle; Linha pontilhada: 15 μM ; Linha tracejada: 30 μM ; Linha sólida: 50 μM . FSC-A: Detector *Foward Scatter* = tamanho de epimastigotas.

Tabela 4.9. Percentual de células com tamanho normal e tamanho pequeno, em relação a epimastigotas controle.

	% Normal	% Pequenas	Tratado/Controle (Pequenas)*
Controle	95,8	4,23	-
15 μM	96,86	3,15	0,74
30 μM	65,3	34,7	8,2 ***
50 μM	63,83	36,17	8,5 ***

* Razão % pequenas de grupos tratados (15, 30 ou 50 μ M) \div % pequenas do controle; *** Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

4.1.2.1.8. Atividade de EPA-35 na integridade de membrana plasmática e no potencial de membrana mitocondrial

Epimastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas foram analisados por citometria de fluxo quanto ao potencial de membrana mitocondrial e a integridade de membrana plasmática. Na análise com rodamina 123 (Rhd) observou-se que houve dissipação do potencial de membrana mitocondrial (Fig. 4.6A,B), com alterações significativas (menos fluorescência) em relação ao controle não tratado (Fig. 4.6B). Entretanto, não se observou permeabilização de membrana plasmática com o mesmo tempo de tratamento (Fig. 4.6C).

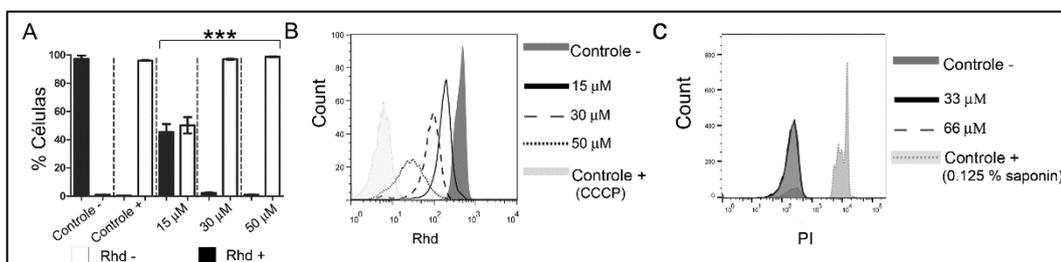


Figura 4.6. Efeito de EPA-35 no potencial de membrana mitocondrial e na integridade de membrana plasmática de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A. Porcentagem de células viáveis (Rodamina 123+) e inviáveis (Rodamina 123-) após tratamento por 24 horas. B. Histograma representativo da análise com Rodamina 123 (Rhd). C. Histograma representativo da análise com iodeto de propídeo (PI).

4.1.2.1.9. Atividade de EPA-35 no ciclo celular de *T. cruzi*

Tratamento por 3 horas com 66 μM de EPA-35 levou a um aumento significativo na porcentagem de células na fase G2-M (Fig. 4.7A). Entretanto esta alteração não foi mais observável após 24 horas de tratamento (Fig. 4.7B). É possível que as células com ciclo celular alterado tenham morrido entre os períodos de análise, já que após 24 horas o tratamento induziu uma significativa diminuição no número de epimastigotas, como observado em 4.1.2.1.3.

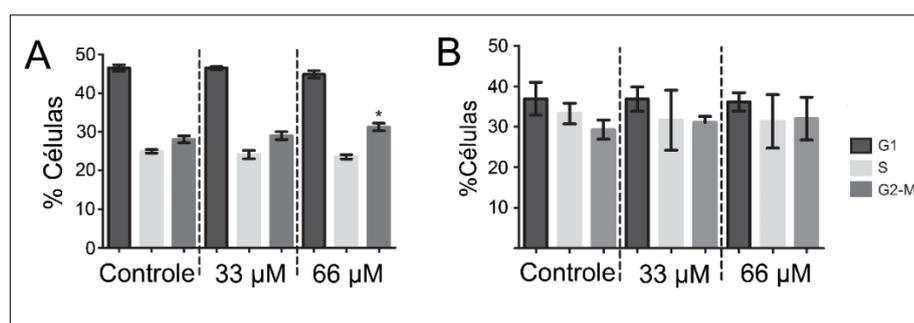


Figura 4.7. Ciclo de divisão celular de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento por 3 ou 24 horas com EPA-35. A. Porcentagem de células em cada fase (G1, S, G2) com 3 horas de tratamento. **B.** Porcentagem de células em cada fase (G1, S, G2) com 24 horas de tratamento.

4.1.2.1.10. Exposição de fosfatidilserina pela atividade de EPA-35 em *T. cruzi*

Epimastigotas tratados por 24 horas com 33 ou 66 μM de EPA-35 foram lavados e incubados com anexina-V-FITC e PI. Em células de mamíferos, um evento precoce na apoptose é a perda de assimetria da membrana plasmática, o que leva à exposição dependente de Ca^{2+} do fosfolípido fosfatidilserina no folheto exterior da membrana. Isto pode ser detectado através da ligação de anexina V (conjugada com fluorescência ou com anticorpos específicos) a fosfatidilserina (Proto, Coombs e Mottram, 2013). Entretanto, eventos tardios de apoptose ou morte celular por necrose, levam a permeabilização de membrana (Jiménez-Ruiz et al., 2010) – identificada pela marcação com PI- podem levar a ocorrência de uma dupla marcação (Anexina V +/- PI+), devido a entrada de anexina V na célula, com consequente marcação de fosfatidilserina no folheto interno da membrana.

No tratamento com EPA-35 não foi possível observar marcação positiva com Anexina-V e/ou PI (Fig. 4.8), indicando que a membrana plasmática destes parasitas encontrava-se intacta, sem discontinuidades e, portanto, não se encontravam em nenhum dos processos de morte celular aqui abordados (apoptose ou necrose).

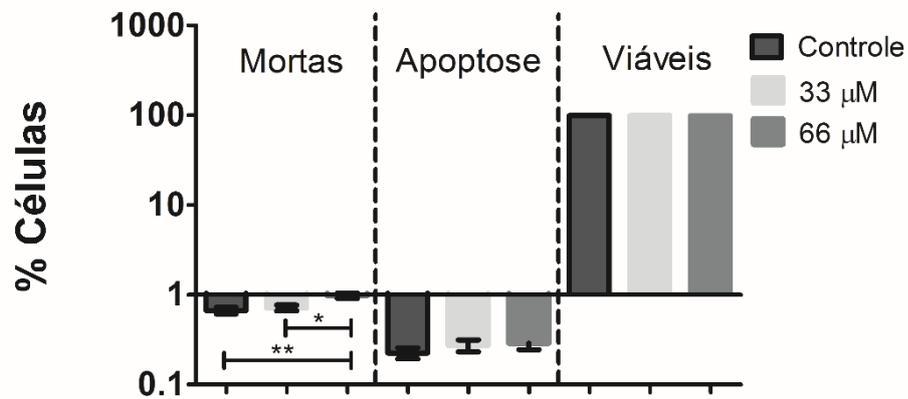


Figura 4.8. Exposição de fosfatidilserina e lise de epimastigotas após o tratamento com EPA-35 por 24 horas.

4.1.2.1.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia de epimastigotas de *T. cruzi* controle (Fig. 4.9A e 4.9B) evidenciou a forma padrão destes parasitas, alongados e fusiformes. No tratamento com a $CI_{50}/24h$ de EPA-35 (33 μM) observamos tanto a presença de células com morfologia normal, semelhante ao controle, quanto a presença de células arredondadas, com redução aparente do tamanho celular (apontado com seta na Fig. 4.9C,D). As mesmas alterações morfológicas foram observadas no tratamento com o dobro da $CI_{50}/24h$ de EPA-35 (66 μM) (Fig. 4.9E,F).

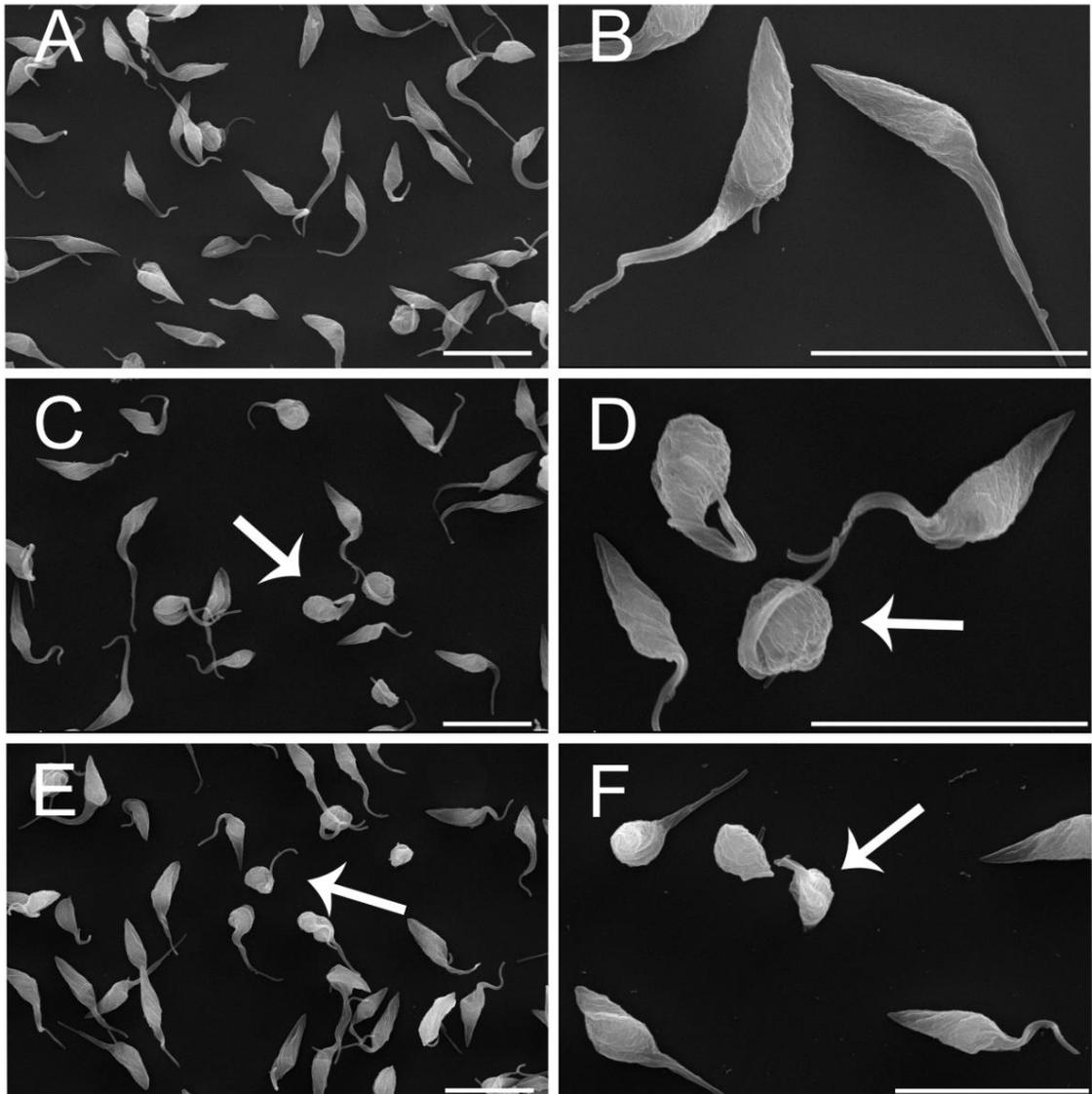


Figura 4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura de epimastigotas tratados por 24 horas com EPA-35. A,B. Controle não-tratado; C,D. $CI_{50}/24h$ EPA-35 ($33 \mu M$); E,F. $2x$ $CI_{50}/24 h$ EPA35 ($66 \mu M$). Barra = $10 \mu M$.

4.1.2.1.12. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Epimastigotas tratados com EPA-35 com 33 μM (4.10B) ou 66 μM (4.10C) não mostraram alterações morfológicas, ficando muito semelhantes a morfologia de epimastigotas controle (Fig 4.10A).

No tratamento de amastigotas intracelulares por 24 horas observou-se um aumento de 19 vezes no IS de EPA-35, que aumentou o valor IS para 95,04 (Tabela 4.7). Ao analisar por MET amastigotas intracelulares tratados com 3 μM (Fig 4.11C,D) ou 6 μM (Fig 4.11E,F) se observou que as amastigotas perderam a morfologia arredondada padrão dos amastigotas (Fig. 4.12A,B), além de ficarem mais eletrondensas.

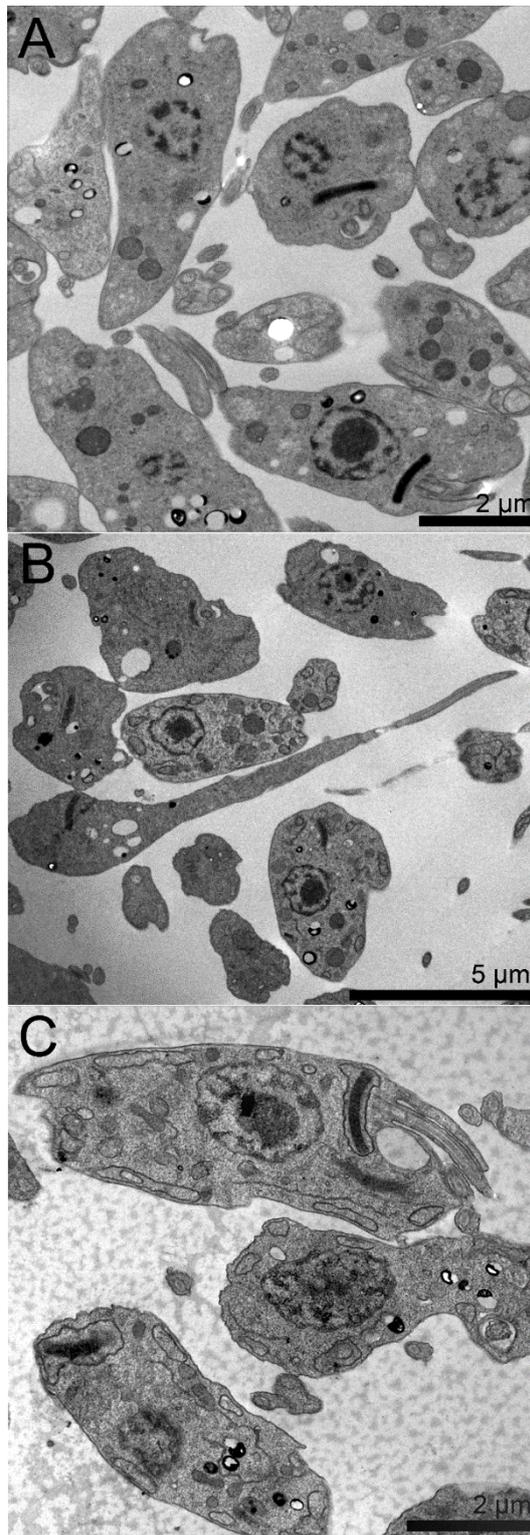


Figura 4.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão de epimastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas. A = Controle não-tratado; B = $CI_{50}/24$ h EPA-35 ($33 \mu\text{M}$); C = $2x$ $CI_{50}/24$ h EPA-35 ($66 \mu\text{M}$);

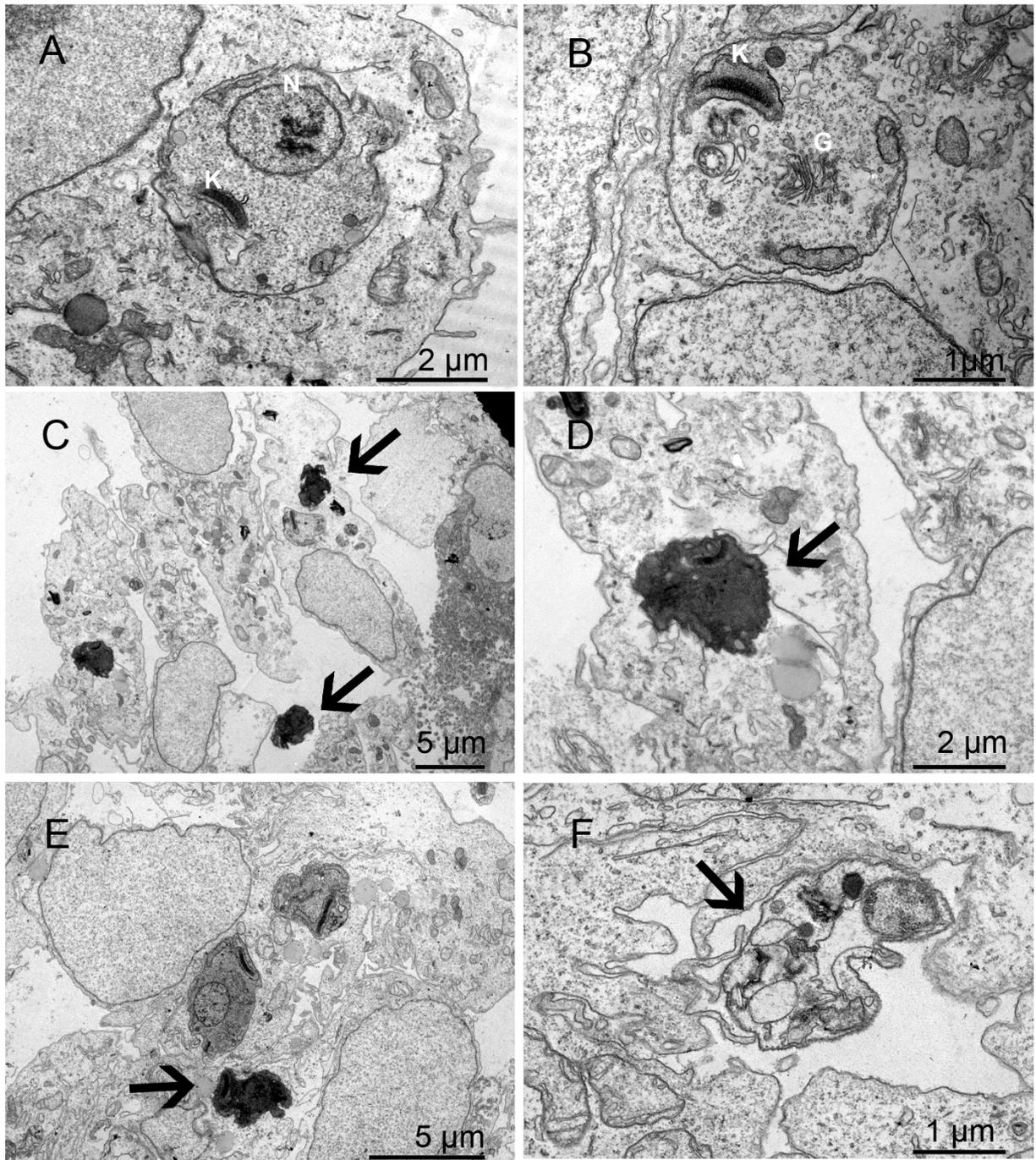


Figura 4.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão de amastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas. A, B = Controle não-tratado. Letras N = Núcleo, K = cinetoplasto, G = Complexo de Golgi; C,D = $CI_{50}/24$ h EPA-35 (3 μ M); E,F = $2x$ $CI_{50}/24$ h GIB-24 (66 μ M); Setas indicam a posição de amastigotas. Setas pretas indicam a presença de amastigotas.

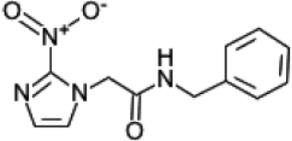
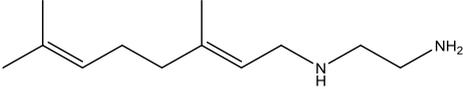
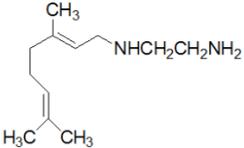
4.1.2.2. Diaminas

4.1.2.2.1. Triagem em formas epimastigotas

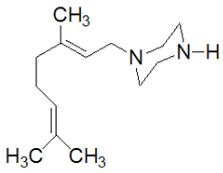
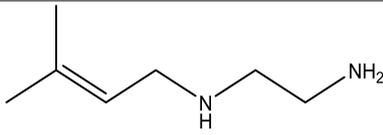
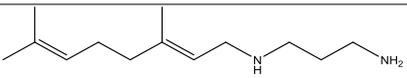
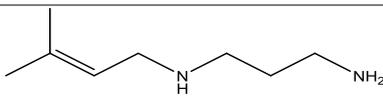
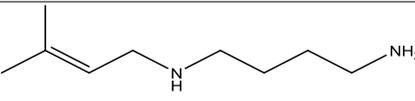
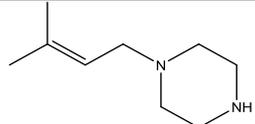
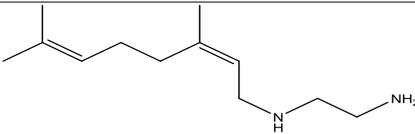
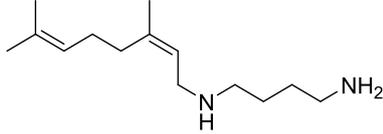
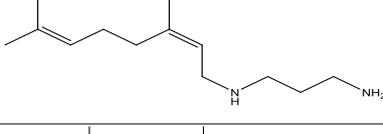
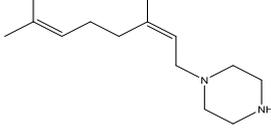
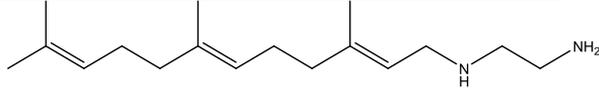
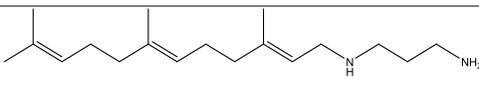
Foram avaliados pelo teste colorimétrico do MTT 17 diaminas contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. Dentre estas diaminas encontramos três com melhor atividade: GSC-01 ($CI_{50} = 14,28 \mu\text{M}$; $CC_{50} = 255 \mu\text{M}$; $IS = 17,86$), GIB-24 ($CI_{50} = 5,645 \mu\text{M}$; $CC_{50} = 92,6 \mu\text{M}$; $IS = 16,4$) e CGE ($CI_{50} = 15,67 \mu\text{M}$; $CC_{50} = 131,4 \mu\text{M}$; $IS = 8,39$). Entretanto, nenhuma das diaminas avaliadas obteve seletividade maior que a do benzonidazol (fármaco de referência), que teve IS de 223,68 ($CI_{50}/24\text{h} = 12,16 \mu\text{M}$; $CC_{50}/24\text{h} = 2720 \mu\text{M}$).

Dentre as diaminas não selecionadas encontram-se algumas que merecem atenção para experimentos futuros, como as diaminas TAS-13, TAS-14 e TAS-15, que não tiveram IS calculado (Tabela 4.10) por não se conseguir avaliar a citotoxicidade com precisão (a concentração máxima avaliada nesta tese foi de $500 \mu\text{M}$). Tais diaminas provavelmente serão bastante seletivas, visto que com as CI_{50} e CC_{50} obtidas até o momento seus IS serão maiores que 17.

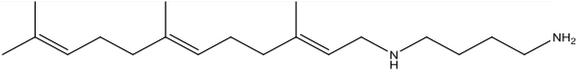
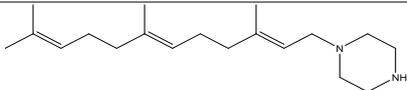
Tabela 4.10. Benzonidazol (BZN), diaminas terpênicas e diamina análoga ao geraniol (CGE) avaliadas na triagem contra formas epimastigotas de *T. cruzi*

Composto	$CI_{50}/24\text{h}$		IS	Estrutura
	Epi (μM)	Vero (μM)		
- BZN	12,16	2720	223,6 8	 (Oliveira et al., 2008a)
1 GSC-01	14,28	255	17,86	
2 GIB24	5, 645	92,6	16,4	 GIB24
3 CGE	15,67	131,4	8,39	

Continuação da Tabela 4.10.

4	GIB 25	48,93	> 60	NA	 <p>GIB25</p>
5	TAS-05(B)	AS	NA	NA	
6	TAS-06	103,8	283,1	2.73	
7	LSP-01	AS	NA	NA	
8	TSP-01	AS	NA	NA	
9	NPD10	60,22	>500	NA	
10	TAS08	46,47	207,9	4,5	
11	TAS09	104,7	305,1	2,91	
12	TAS10	57,6	139,8	2,43	
13	TAS11	AS	510,6	NA	
14	TAS12	23,63	32,33	1,37	
15	TAS13	<25	> 500	NA	

Continuação da Tabela 4.10.

16	TAS14	29,03	> 500	NA	
17	TAS15	29,03	> 500	NA	

SA = Sem atividade até 100 μM ; NA = Não avaliado

4.1.2.2.2. Atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares

Das três diaminas avaliadas, a diamina denominada de CGE apresentou um aumento de 1,3 vezes no IS em formas amastigotas intracelulares (24 horas de tratamento; Tabela 4.11), quando comparado ao IS do composto em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 4.10). As diaminas GIB-24 e GSC-01 apresentaram menor seletividade nesta forma evolutiva de *T. cruzi*, obtendo IS com valores de 7,18 e 10,04, respectivamente.

Tabela 4.11. Atividade dos compostos selecionados contra amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

Composto	CI ₅₀ /24h	CC ₅₀ /24h	IS
	Infecção	Vero	
BZN	6,86 μM	2720 μM	396,50
CGE	11,9712 μM	131,4 μM	10,97
GSC-01	25,3942 μM	255 μM	10,04
GIB-24	12,8867 μM	92,6 μM	7,18

4.1.2.2.3. Quantificação de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas

Epimastigotas tratados com 3, 6 e 10 μM de GIB-24 foram contados após 24 horas de tratamento a fim de confirmar se de fato ocorre a diminuição de células devido a morte por inviabilidade da mitocôndria, indicada pelo método colorimétrico do MTT utilizado na triagem de atividade dos compostos. Foi possível observar que em todas as concentrações houve redução significativa da quantidade de células em relação ao controle (Fig. 4.12).

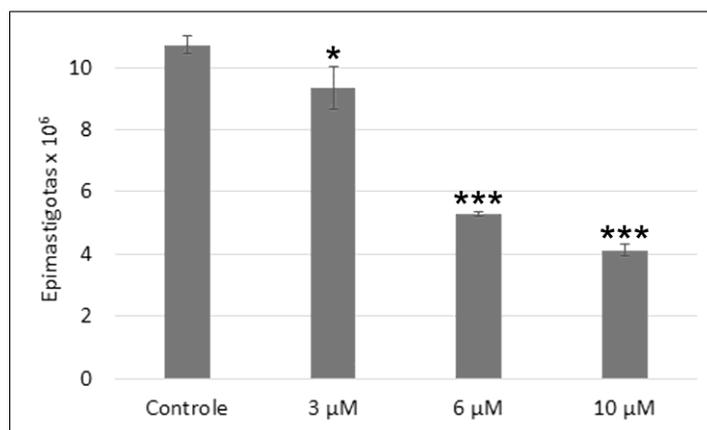


Figura 4.12. Quantificação de epimastigotas tratados com GIB-24 após 24 horas.

*** $p < 0,0001$

4.1.2.2.4. Atividade da combinação GIB-24 e Benzonidazol em epimastigotas de *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar se o uso combinado de GIB-24 potencializaria a atividade de benzonidazol (BZN), e vice-versa, foram feitas combinações com as concentrações 6 μM, 3 μM e 1,5 μM de GIB24 e 15 μM, 7,5 μM e 3,75 μM de BZN.

A partir dos dados de inibição de crescimento de formas epimastigotas obteve-se curvas concentração-efeito (Fig. 4.13A) e um isoblograma (Fig. 4.13B) utilizando-se o software CompuSyn. Os resultados foram interpretados utilizando o Índice de Combinação (*Combination Index* = CI), uma medida quantitativa do grau de interação da droga em termos de sinergia e antagonismo (CI<1: sinergia; CI=1: indiferença; CI>1 antagonismo) para um determinado parâmetro de medição efeito (Chou e Talalay, 1981), e o índice de redução da dose (DRI), uma medida de quantas vezes a dose de cada composto pode ser reduzida numa combinação sinérgica, para se obter um determinado grau de efeito (por exemplo, 50%, 75%, 90% de inibição), quando comparado com as doses de cada composto sozinho (Azeredo e Soares, 2013).

Na combinação GIB-24+BZN observou-se a existência de um forte antagonismo, ficando todos os pontos experimentais da combinação com valores superiores a 1 (Fig. 4.13B, Tabela 4.12). Portanto, GIB-24 não deve ser utilizado para um possível tratamento combinatório com BZN, e vice-versa, na atual estrutura química. Alterações na estrutura química de GIB-24 poderiam levar a síntese de compostos viáveis para este tipo de tratamento.

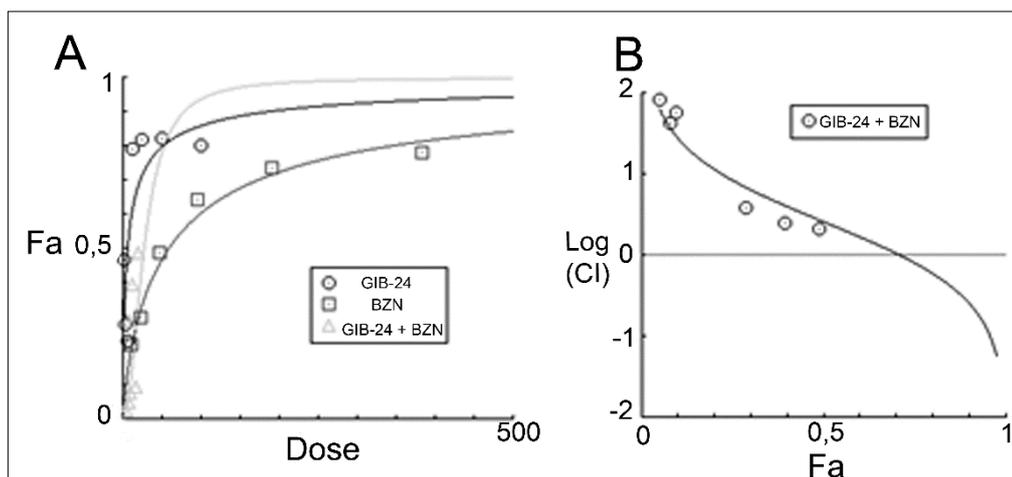


Figura 4.13. Efeito da combinação de GIB24 + BZN contra epimastigotas de *T. cruzi*. **A.** concentração-efeito. **B.** Isoblograma. Fa= Fração de células afetadas

Tabela 4.12. Valores CI para cada ponto experimental da combinação GIB24 +BZN.

GIB-24 em μM	BZN em μM	Total (GIB24 +BZN em μM)	Efeito (Fa)	Índice de Combinação (CI)
6	15	21,0	0,49	2,15
6	7,5	13,5	0,39	2,54
6	3,75	9,75	0,29	3,84
3	15	18,0	0,095	58,58
3	7,5	9,5	0,08	42,66
1,5	7,5	9,0	0,05	82,46
1,5	3,45	5,25	0,027	137,36

4.1.2.2.5. Atividade de GIB-24 em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Após 4 horas de tratamento com GIB-24 não se observou quantidade significativa de lise dos tripomastigotas tratados (Fig. 4.14). Entretanto, houve um aumento dose-dependente na porcentagem de amastigotas presentes, com consequente diminuição das formas tripomastigotas inicialmente semeadas (Fig. 4.14B). Esta diferença foi significativa ($p < 0,05$) no tratamento com $25 \mu\text{M}$, sugerindo que GIB-24 pode estar aumentando a taxa de diferenciação dos parasitas.

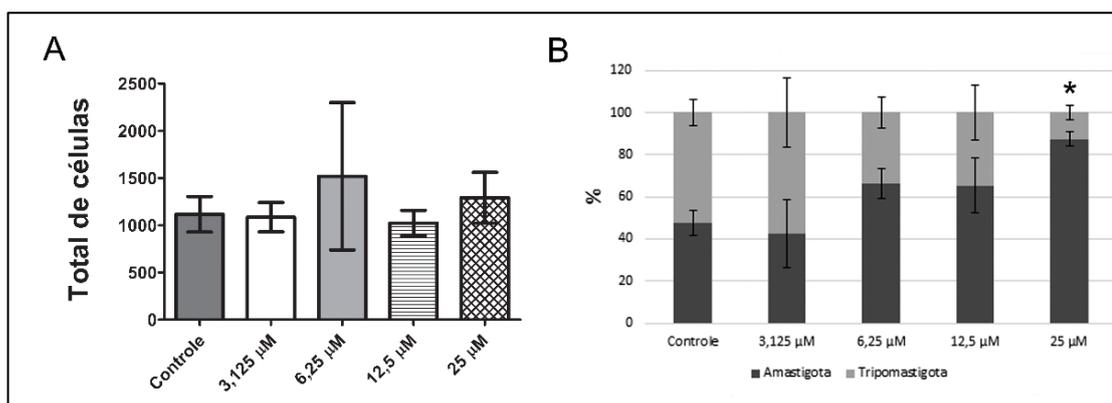


Figura 4.14. Tripomastigotas x GIB-24, após 4 horas de tratamento. A. Média do total de células (amastigotas + tripomastigotas) após 4 horas de tratamento. **B.** Porcentagem relativa de tripomastigotas e amastigotas após 4 horas de tratamento. *Significativamente diferente do controle (não tratado); $p < 0,05$.

4.1.2.2.6. Atividade tripanocida no ciclo intracelular de *T. cruzi*

Células Vero infectadas com GIB-24 foram acompanhadas até que tripomastigotas fossem liberados no sobrenadante de infecções não tratadas (controle), o que ocorre no quarto dia de infecção (96 horas), com 72 horas de tratamento. Foi possível observar que o tratamento levou a uma diminuição significativa da quantidade de células (tripomastigotas + amastigotas) presentes no sobrenadante em todas as concentrações avaliadas (Fig. 4.15). Além disso, o tratamento induziu significativo aumento na porcentagem relativa de amastigotas, com consequente diminuição de tripomastigotas no sobrenadante das infecções (Fig. 4.15B; Tabela 4.13).

A avaliação de citotoxicidade em células Vero não infectadas tratadas por 72 horas com GIB-24 resultou num valor de $CC_{50/72}$ h de 309,6 μ M, enquanto BZN não induziu citotoxicidade em concentrações de até 3842,70 μ M. Assim, a diminuição dose-dependente na contagem média de parasitas não pode ser atribuída à citotoxicidade em células hospedeiras.

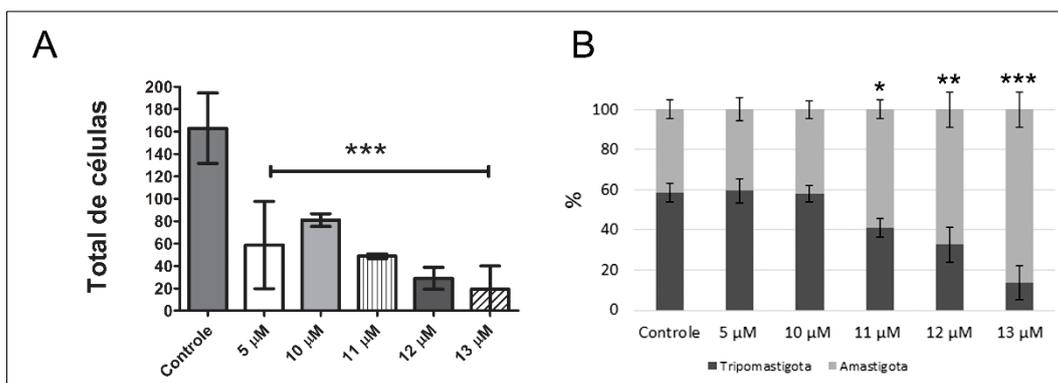


Figura 4.15. Efeito de GIB-24 no ciclo intracelular de amastigotas de *T. cruzi* após incubação durante 72h.. A. Média do total de células (amastigotas + tripomastigotas) presentes no sobrenadante de infecções após 72 horas de tratamento. **B.** Porcentagem relativa de tripomastigotas e amastigotas presentes no sobrenadante. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (não tratado); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Tabela 4.13. Razão amastigotas/tripomastigotas presentes no sobrenadante das culturas após 72 horas de tratamento com GIB-24.

	Controle	13 μ M	12 μ M	11 μ M	10 μ M	5 μ M
%Ama/%Tripo	0,70	6,26	2,05	1,43	0,72	0,68

4.1.2.2.7. Avaliação de pH do meio de culturas tratadas com GIB24

A fim de avaliar se o tratamento com GIB-24 alterava o pH de culturas tratadas, aferiu-se o pH do meio de cultura de células Vero não infectadas, de células Vero infectadas e meio DMEM puro incubados com 5, 10, 11, 12 ou 13 μ M de GIB-24 por 48 horas. Em cultura de células Vero infectadas novamente se observa uma tendência a uma alcalinização do meio (Fig. 4.16C). Entretanto, nenhuma das alterações observadas foi significativa estatisticamente. Portanto, a presença de GIB-24 não altera o pH do meio. Sendo assim, qualquer alteração observada nas culturas tratadas foi devido a alterações celulares promovidas pelo tratamento.

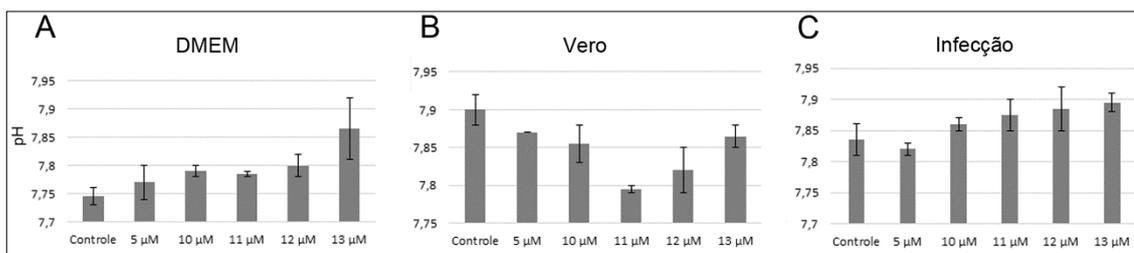


Figura 4.16. GIB-24 x pH após 48 horas de tratamento. A. Meio DMEM puro incubado com GIB24. **B.** Células Vero não infectadas tratados com GIB24. **C.** Células Vero infectadas com *T. cruzi* Dm28c tratadas com GIB24.

4.1.2.2.8. Alteração de tamanho celular de epimastigotas tratados com GIB-24

Epimastigotas tratados por 24 horas foram analisados por citometria de fluxo quanto ao tamanho celular (FSC-A). Epimastigotas não tratados (controle) foram utilizados como padrão de tamanho celular. Foi possível observar que tratamentos com 6 µM e 12 µM levaram a um aumento significativo (na ordem de 14 e 41 vezes, respectivamente) na porcentagem de parasitas considerados menores (Fig. 4.17).

A redução da mediana de fluorescência indica quantas vezes a população de células pequenass aumentaram ou diminuíram de tamanho em relação ao controle. Utilizando esta medida foi possível observar que a redução do tamanho celular foi na razão de 1,18, 1,76 e 1,78 com os tratamentos de 3, 6 e 12 µM, respectivamente (Tabela 4.14), sendo a redução causada pelos tratamentos com 6 e 12 µM significativas. Já nas células dentro do *gate* de padrão normal de epimastigotas houve um aumento significativo no tamanho celular com os tratamentos de 3 e 6 µM e uma leve redução no tamanho com o tratamento de 12 µM, esta última não significativa estatisticamente.

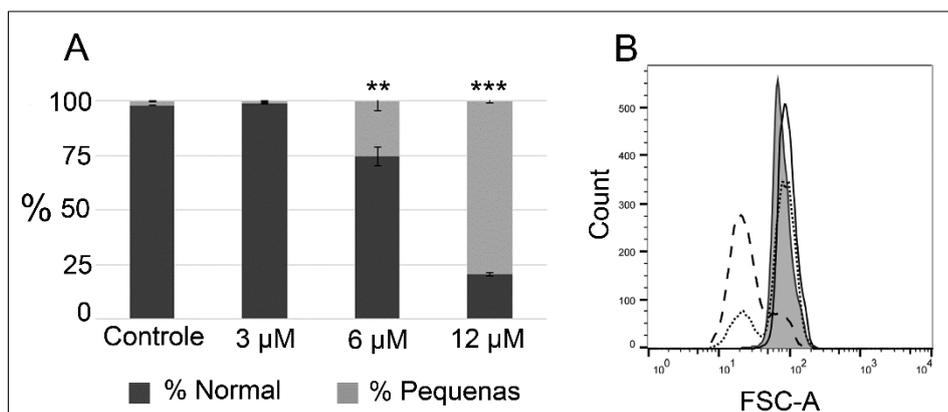


Figura 4.17. Tamanho de epimastigotas ap3s 24 horas de tratamento com GIB-24; A. Porcentagem de c3lulas normais (%Normal: controle utilizado como padr3o de tamanho celular) e c3lulas menores (%pequenas). **B.** Histograma representativo do padr3o de tamanho celular (FSC-A) ap3s 24 horas de tratamento cm GIB-24. Cinza =Controle; Linha s3lida =3 μM ; Linha pontilhada = 6 μM ; Linha tracejada = 12 μM . FSC-A: Detector *Foward Scatter* = tamanho de epimastigotas.

Tabela 4.14. Raz3o da redu33o de tamanho de epimastigotas tratados com GIB-24

	Mediana Normal	Raz3o Controle/ Tratados	Mediana Pequena	Raz3o Controle/ Tratados
Controle	75,35	1	36,25	1
3 μM	90,6	0,83	30,7	1,18
6 μM	84,8	0,89	20,6	1,76
12 μM	71,2	1,06	20,4	1,78

4.1.2.2.9. Atividade de GIB-24 na integridade de membrana plasm3tica

Epimastigotas tratados com 3, 6 ou 12 μM foram avaliados utilizando iodeto de prop3deo por citometria de fluxo. Iodeto de prop3deo (PI) 3 um marcador fluorescente que liga-se ao DNA por intercalaç3o entre as bases com pouca ou nenhuma prefer3ncia de sequ3ncia. Normalmente as c3lulas n3o s3o perme3veis ao PI, somente marcando o DNA destas quando h3 alguma descontinuidade/poro na membrana plasm3tica. O m3ximo de excita33o deste marcador 3 a 535 nm e o m3ximo de emiss3o de fluoresc3ncia 3 a 617 nm (faixa do vermelho).

Ao avaliar a integridade de membrana plasmática (Fig. 4.18) observamos que com apenas 6 horas de tratamento a 12 μM ($2\times\text{CI}_{50}/24\text{h}$) já há um aumento significativo de epimastigotas que apresentaram poros na membrana e consequentemente tiveram marcação positiva (PI+). Esta diferença aumentou drasticamente com o decorrer das horas, alcançando com 48 horas de tratamento 47,5 vezes mais células com poros (PI+) que o controle (não tratado). O tratamento com 6 μM ($\text{CI}_{50}/24\text{h}$) também levou a alteração significativa (Fig. 4.19) da membrana plasmática, após 24 horas de tratamento. Após 48 horas, o aumento de alteração em epimastigotas tratados com 6 μM PI+ foi de 15,9 vezes em relação ao controle negativo (não tratado).

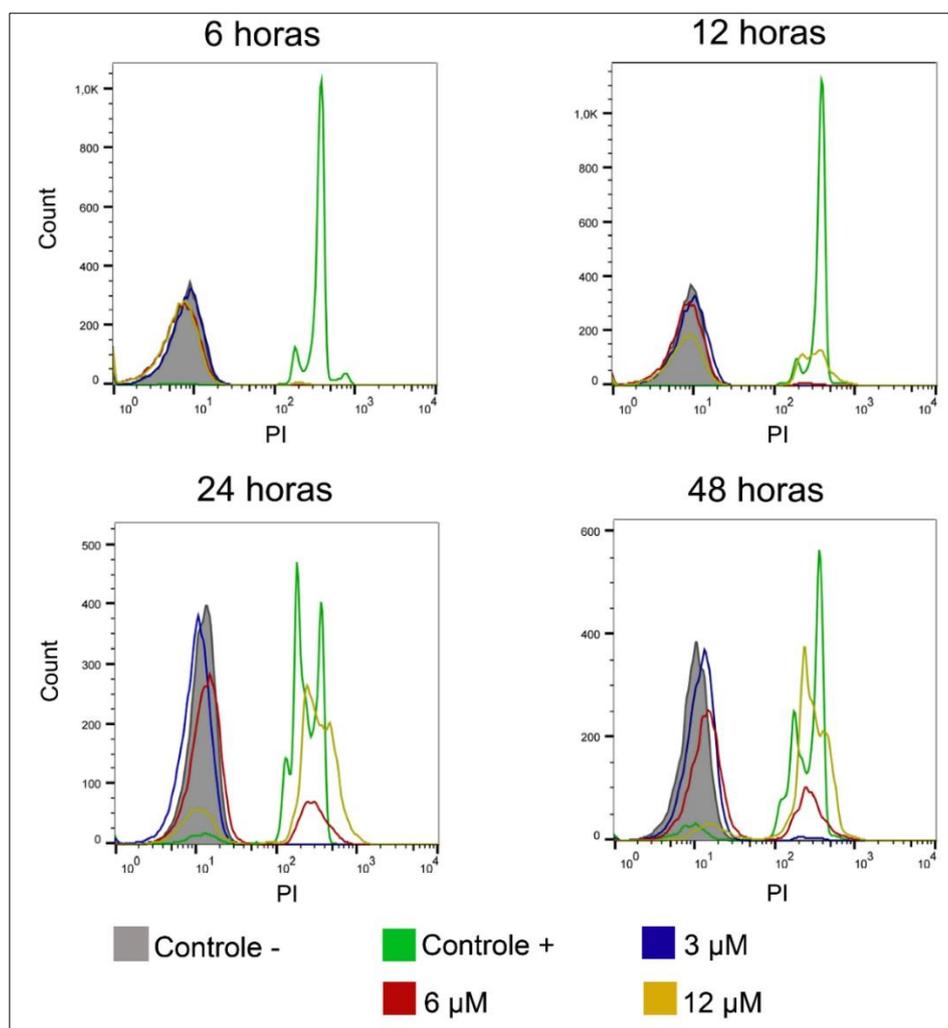


Figura 4.18. Histogramas representativos da análise de integridade de membrana plasmática de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas. Análise com iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo.

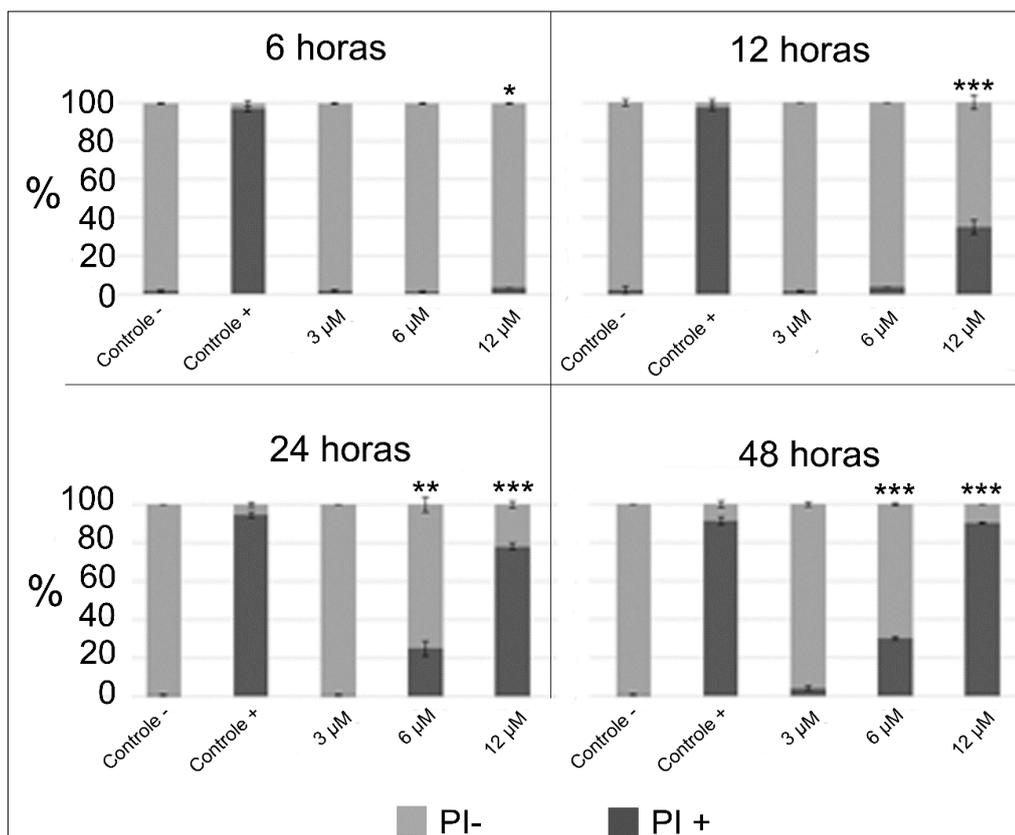


Figura 4.19. Quantificação de população na análise de integridade de membrana plasmática de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas. Diferenças entre quantidade (%) de população positiva (PI + = membrana porosa) e população negativa (PI - = membrana intacta) para PI. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (não tratado); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

4.1.2.2.10. Atividade de GIB-24 no potencial de membrana mitocondrial

A rodamina 123 (Rhd) é um corante catiônico, permeável a células, que fluoresce na faixa de luz verde e é prontamente sequestrado por mitocôndrias sem efeitos citotóxicos. Células vivas, com o potencial de membrana mitocondrial normal, ficam fluorescentes (Rhd+). Alterações no potencial de membrana mitocondrial fazem com que as células percam a fluorescência e, portanto, células inviáveis terão uma redução na fluorescência. A avaliação por citometria de fluxo de epimastigotas tratados com GIB-24 (Figs. 4.19 e 4.20) mostrou que o composto reduziu significativamente o potencial de membrana mitocondrial com 6 horas de tratamento nas concentrações de 6 e 12 μM , aumentando a porcentagem de células não marcadas (Rhd-) em relação ao controle não tratado na ordem de 4,4 e 4,6, respectivamente. Essa diferença significativa manteve-se até o ponto de 24 horas de tratamento. Após 48 horas

apenas o tratamento com 12 μM apresentou diferença significativa entre células Rhd+ / Rhd- em relação ao controle, o que pode ser devido à morte celular dos parasitas nesse tempo.

Tratamento com 3 μM de GIB-24 induziu um aumento significativo de epimastigotas Rhd- (não viáveis, com potencial de membrana mitocondrial alterado) apenas com 12 horas de tratamento. Com 24 e 48 horas não se observou mais esta alteração significativa no potencial de membrana mitocondrial. Possivelmente as células sensíveis a 3 μM de GIB-24 morreram, como observado pela diminuição em quantidade de células após o tratamento por 24 horas com GIB-24 (Fig 4.12), e assim a atividade do composto no potencial de membrana mitocondrial não foi mais observada nos pontos de análise posteriores (24 e 28 horas).

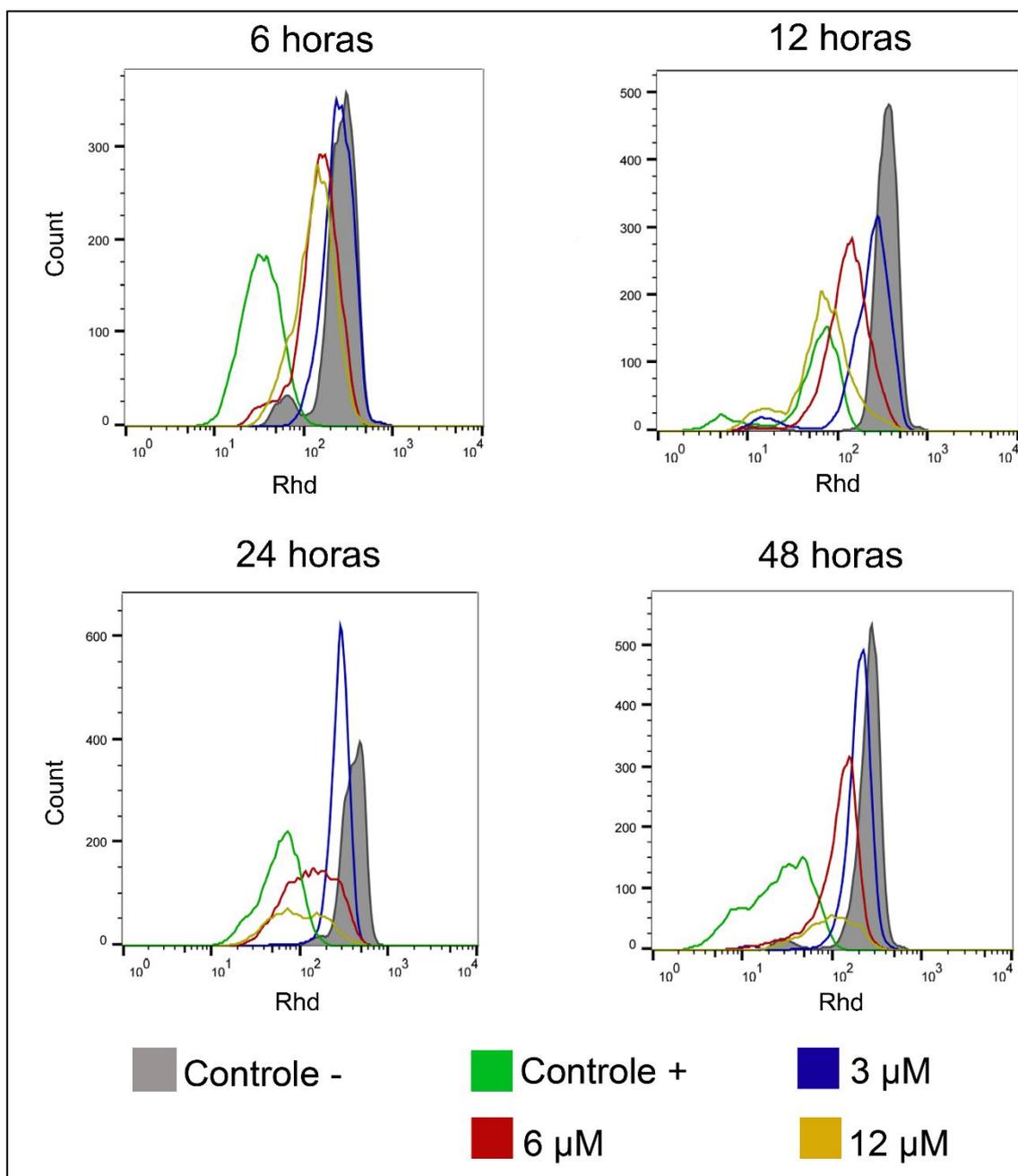


Figura 4.19. Histogramas representativos da análise de potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas.

Controle + = CCCP 200 μ M.

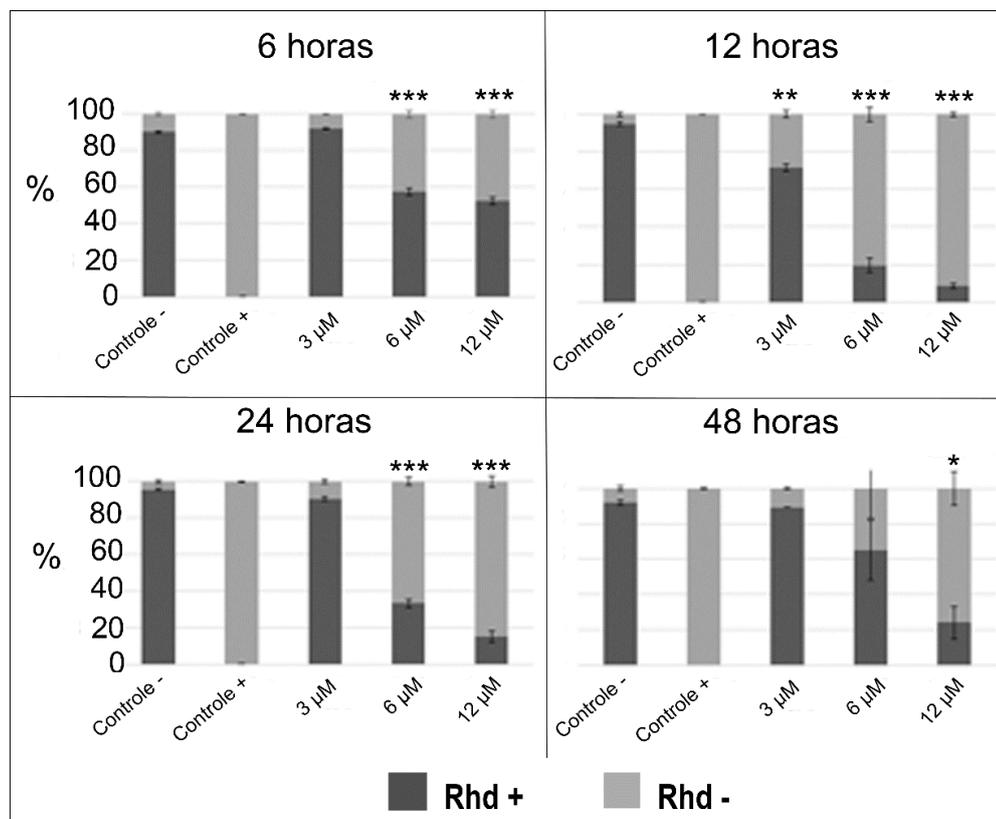


Figura 4.20. Quantificação de população na análise de potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com GIB-24 ao longo de 48 horas.

Diferenças entre quantidade (%) de população positiva (Rhd+ = potencial de membrana mitocondrial normal) e população negativa (Rhd- = alteração/perda de potencial de membrana mitocondrial) para Rhd. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (não tratado); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

4.1.2.2.11. Atividade de GIB-24 no ciclo celular de *T. cruzi*

A avaliação do ciclo celular foi realizada utilizando-se uma solução para marcação de DNA com PI após permeabilização da membrana celular. Com apenas 3 horas de tratamento (Fig. 4.21) observa-se que houve parada no ciclo celular, ficando a maioria dos epimastigotas tratados (6 e 12 μ M) na fase G1, com conseqüente diminuição de parasitas nas fases S e G2-M, em relação a células controle (não tratado). Após 24 horas este fenômeno não é mais significativo com a concentração de 6 μ M, ocorrendo uma diminuição significativa de epimastigotas na fase G2-M apenas com o tratamento de 12 μ M.

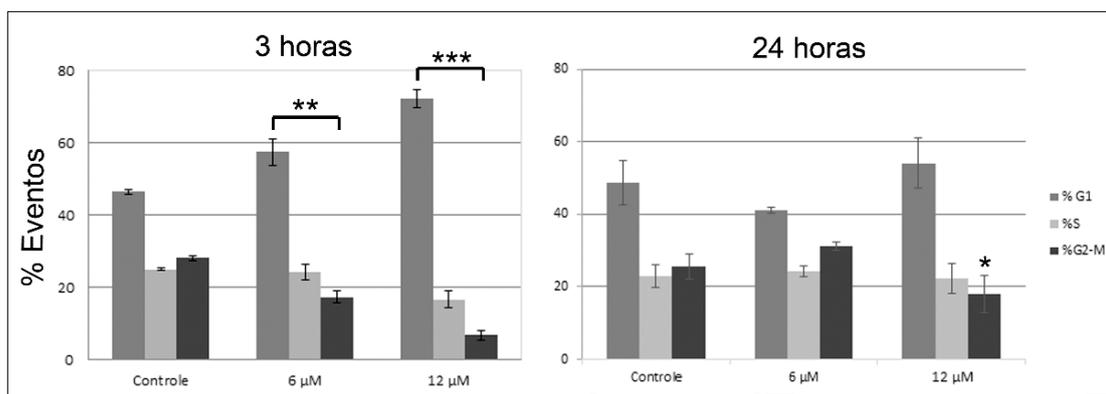


Figura 4.21. Ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com GIB-24. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (não tratado); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

4.1.2.2.12. Exposição de fosfatidilserina pela atividade de GIB-24 em *T. cruzi*

Epimastigotas tratados por 24 horas com 6 ou 12 μM de GIB-24 foram lavados e incubados com anexina-V-FITC e PI. Como já comentado anteriormente (4.1.2.1.10.), a anexina-V é uma proteína que se liga a fosfatidilserina exposta na superfície de membranas plasmáticas de células que entraram em processo de apoptose (Jiménez-Ruiz et al., 2010). O iodeto de propídio (PI) somente irá marcar o DNA daquelas células que tiverem alguma descontinuidade de membrana/poro. Isto ocorrerá tanto em células em apoptose tardia, quanto em células necróticas.

O tratamento induziu um aumento significativo de células em apoptose inicial (ou clássica; Anexina+, PI-) e em apoptose tardia ou necrosadas (Anexina +, PI+), quando comparadas a culturas controle (Fig. 4.22). No tratamento com 6 μM a população de células marcadas apenas com Anexina-V (apoptose inicial) aumentou em 2,6 vezes em relação ao controle. Já a marcação de epimastigotas em apoptose tardia ou necrosadas (Anexina+ / PI+ somadas às células Anexina - / PI+) aumentou em 4,18 vezes em relação ao controle quando tratadas com a $CI_{50}/24\text{h}$ (6 μM). Entretanto estas diferenças não foram consideradas significativas. Quando os parasitas foram tratados com o dobro da $CI_{50}/24\text{h}$ (12 μM), houve aumento significativo na porcentagem de epimastigotas em apoptose inicial (20,54 vezes) e na porcentagem de epimastigotas em apoptose tardia ou necrose (87,72 vezes), quando comparadas a culturas controle (Tabela 4.15).

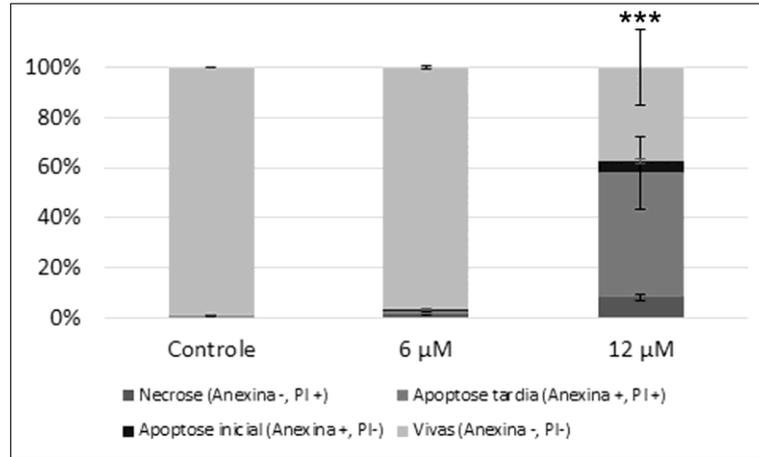


Figura 4.22. Avaliação da morte celular promovida por GIB-24 em epimastigotas de *T. cruzi*

Tabela 4.15. Porcentagens de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas e marcados apenas com Anexina-V (Anexina- / PI-; apoptose inicial), com Anexina-V+PI (Anexina+ / PI+; apoptose tardia ou necrose), ou não marcados (Anexina- / PI-; viáveis) e razão de aumento nas respectivas marcações em relação ao controle

GIB-24	Apoptose inicial	Apoptose tardia ou Necrose	Vivas
Controle	0,23%	0,67%	99,13%
6 uM	0,59%	2,80%	96,62%
Razão Tratado / Ctrl	2,6	4,18	0,97
12 uM	4,62%	57,96%	37,42%
Razão Tratado / Ctrl	20,54	87,72	0,377

4.1.2.2.13. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Epimastigotas de *T. cruzi* possuem tipicamente forma alongada, fusiforme (Fig. 4.23), sendo possível observar também a torção em espiral do corpo do parasita devido ao citoesqueleto de microtubulos (Fig. 4.23B). O tratamento com GIB-24 por 24 horas induziu a alteração na morfologia de epimastigotas, observando-se muitos parasitas que deixaram de ter

a forma tipicamente alongada para apresentar forma arredondada e aparentemente enrugada quando tratados tanto com 6 μM (Fig. 4.23C,D) quanto com 12 μM (Fig. 4.23E,F). Tal alteração sugere um mecanismo de extravasamento de conteúdo celular e/ou alteração no citoesqueleto destes parasitas.

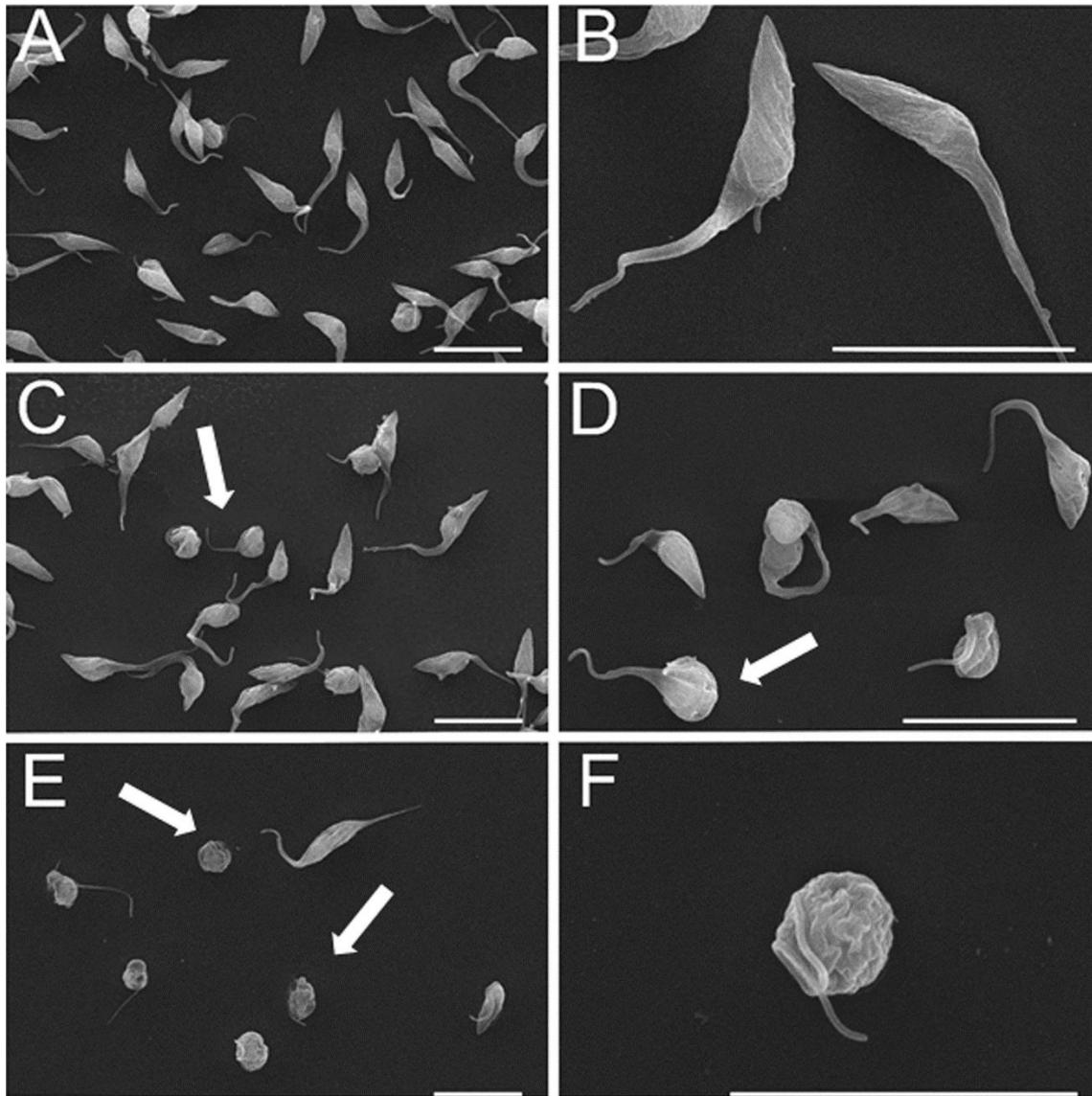


Figura 4.23. Microscopia Eletrônica de Varredura de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas. A e B = Controle não-tratado; C e D = $CI_{50}/24$ h EPA35 (33 μM); E e F = 2x $CI_{50}/24$ h EPA35 (66 μM). Barra = 10 μM .

4.1.2.2.14. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Tratamento com 6 μM de GIB-24 provocou o aparecimento de diversos vacúolos no citoplasma das células (Fig. 4.24B). Entretanto, não foi possível observar alterações de membrana ou em organelas celulares. Essa vacuolização aumentou com uso de 12 μM de GIB-24 (Fig. 4.24C), com esvaziamento do citoplasma. Em amastigotas intracelulares (Fig 4.25) não foi possível observar alterações em relação ao controle (Fig 4.25A,B).

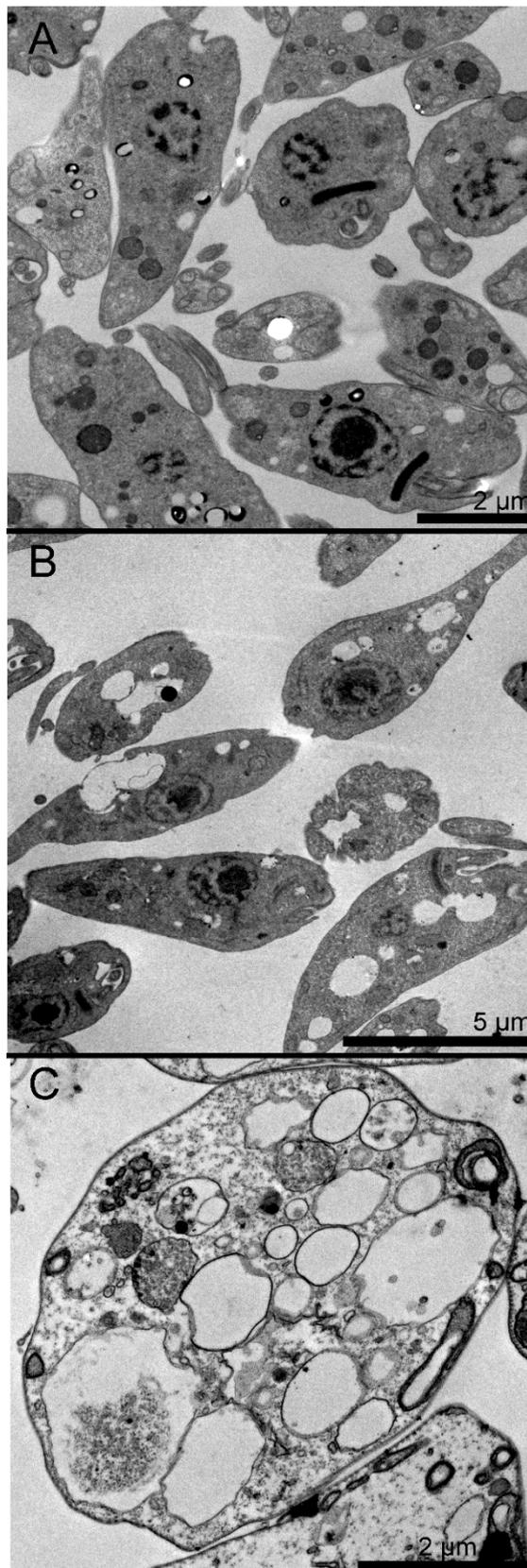


Figura 4.24. Microscopia Eletrônica de Transmissão de epimastigotas tratados com GIB-24 por 24 horas. A = Controle não-tratado; B = CI₅₀/24 h GIB-24 (6 μM); C = 2x CI₅₀/24 h GIB-24 (12 μM)

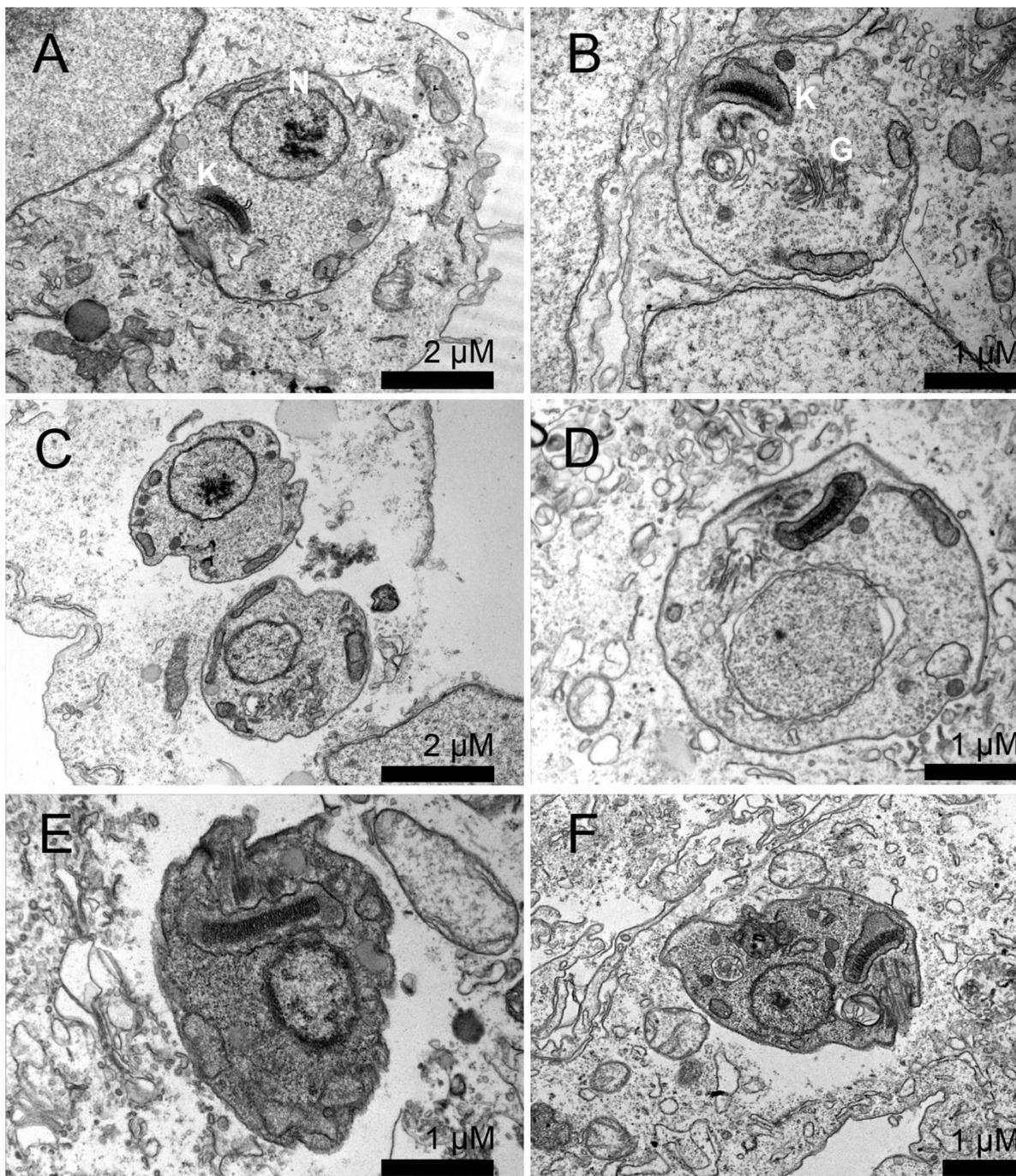


Figura 4.25. Microscopia Eletrônica de Transmissão de amastigotas intracelulares de infecções tratados com GIB-24 por 24 horas. A, B = Controle não-tratado; Letras em branco: N = núcleo, K = cinetoplasto, G = Complexo de Golgi; C, D = $CI_{50}/24$ h GIB-24 (13 μ M); E, F = 2x $CI_{50}/24$ h GIB-24 (26 μ M);

4.1.2.2.15. Seleção e curva de crescimento de epimastigotas resistentes a GIB-24

Epimastigotas de *T. cruzi* foram selecionados em duplicata biológica em cultivos com concentração crescente de GIB-24 até alcançar o máximo de 15 μ M (aproximadamente $2,5 \times CI_{50}/24h$). O tempo de seleção foi de 2 meses, seguidos de mais 5 meses de cultivo na concentração de 15 μ M. Com estes epimastigotas resistentes foi realizada a curva de crescimento (Fig. 4.26), a qual foi acompanhada por oito dias consecutivos, possibilitando observar que os parasitas resistentes apesar de crescerem mais lentamente que o controle (selvagem, não tratado) acompanham a curva de crescimento normal.

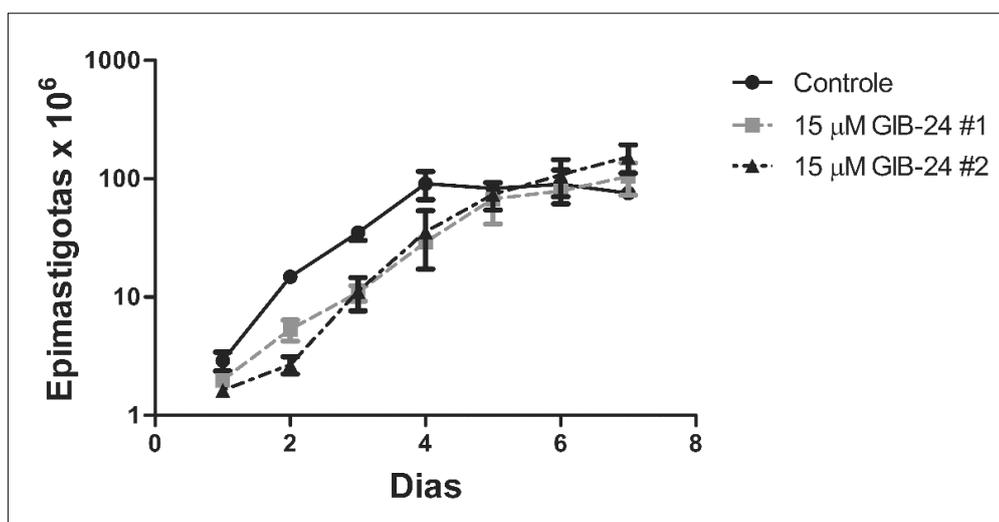


Figura 4.26. Curva de crescimento de epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24.

4.1.2.2.16. Integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas resistentes a GIB-24

Por citometria de fluxo se avaliou a integridade de membrana plasmática (PI) e o potencial de membrana mitocondrial (Rhd) dos epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB24. Na avaliação com PI (Fig. 4.27A) observou-se que em ambas as réplicas biológicas (GIB-24 #1 e GIB-24 #2) a presença de 15 μ M não alterou significativamente a integridade de membrana. Esta alteração significativa sendo observada apenas em epimastigotas selvagens tratados com 15 μ M de GIB-24, evidenciando que a seleção foi eficiente e nos parasitas resistentes não há mais esse efeito causado pelo tratamento com o composto. Resultado semelhante se observa também ao avaliar o potencial de membrana mitocondrial (Fig. 4.27B) em que, novamente, o efeito com diferença estatística só é observado no tratamento de parasitas selvagens com GIB-24.

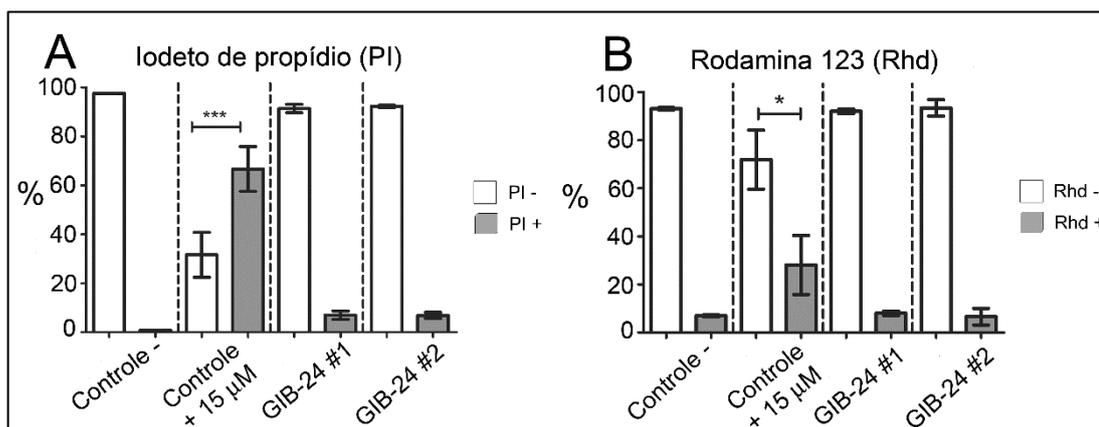


Figura 4.27. Avaliação da integridade de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas resistentes a 15 µM de GIB-24. A. Quantidade (%) de epimastigotas com membrana plasmática íntegra (PI-) ou não (PI+) após tratamento por 72 horas. **B.** Quantidade de epimastigotas com alteração no potencial de membrana mitocondrial (Rhd-) ou sem alteração (Rhd+) após tratamento.

4.1.2.2.17. Análise do perfil proteômico de epimastigotas resistentes a GIB-24.

A análise proteômica resultou na identificação de 3954 proteínas no total. Após a exclusão de contaminantes e possíveis falsas identificações (*Reverse e Only Identified by site*), houve redução para 3810 proteínas no total. Destas foram consideradas com diferença significativa de expressão (teste t de Student), 71 proteínas (Anexo 3). Além destas proteínas, foram identificadas mais 5 proteínas presentes nos epimastigotas resistentes a 15 µM de GIB-24 que não estão presentes no Controle (Anexo 4) e outras 5 presentes somente nos epimastigotas controle (Anexo 5).

Com estas 81 proteínas, realizou-se análise de enriquecimento de termos GO (*Gene Ontology*) no TritypDB, a qual identificou um enriquecimento significativo (valor-p e Benjamini $\leq 0,05$) em proteínas envolvidas com processos biossintéticos metabólicos em geral, no transporte mitocondrial e na homeostase celular, incluindo homeostase redox celular (Tabela 4.16: Termos GOBP). Apontou ainda o enriquecimento de proteínas que atuam como componentes de membrana plasmática, de organelas e mitocondriais (Tabela 4.17: Termos GOCC). As funções moleculares desempenhadas, de acordo com o enriquecimento de termos GOMF (funções moleculares), estão envolvidas principalmente com o transporte de moléculas (Tabela 4.18: Termos GOMF).

Dentre as 71 proteínas com diferença significativa em quantidade, foram selecionadas 24 proteínas que possuem diferença de intensidade média (*fold change*) ≥ 2 ou ≥ -2 (ou ≥ 1 e ≥ -1 quando em escala Log2). Dentre estas 24 proteínas apenas uma é uma proteína devidamente caracterizada, a KAP6, 13 são proteínas hipotéticas e 10 são proteínas putativas. Após a realização de busca nos bancos de dados TriTrypDB e no pFAM para identificação das proteínas e atribuição de domínios funcionais, a grande maioria destas proteínas como exposto na Tabela 4.19 podem ser agrupadas nos seguintes grandes grupos:

- A) Mitocôndria e ciclo de Krebs: KAP6 (Tc00.1047053509791.120), Aspartato Aminotransferase putativa (Tc00.1047053503679.10); Glutamato desidrogenase putativa (Tc00.1047053508111.30); e uma Cobre chaperona citocromo c oxidase (COX17; Tc00.1047053508153.994);
- B) Geração ou controle de estresse oxidativo: Hipotética com domínio tioredoxina (Tc00.1047053511181.20); Hipotética com domínio heme-peroxidase (Tc00.1047053507011.130); Hipotética com domínio Tiosulfato sulfurtransferase (Tc00.1047053506753.130); Alcool desidrogenase putativa (Tc00.1047053511277.60) ;
- C) Metabolismo de aminoácidos: Leucil aminopeptidase citosólica putativa (Tc00.1047053509859.40); Glutamato desidrogenase putativa (Tc00.1047053508111.30); Hipotética com domínio Amino-transferase classe IV (Tc00.1047053506559.410); Aspartato Aminotransferase putativa (Tc00.1047053503679.10)

Ao analisar proteínas presentes ou ausentes no controle ou nos epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24 (Anexos 4 e 5) observamos alterações pontuais, tendo 5 proteínas presentes somente em epimastigotas controle e 5 proteínas presente somente em epimastigotas resistentes a GIB-24, somando um total de 10 proteínas. Destas, devemos destacar que uma elongase de ácidos graxos putativa (Tc00.1047053511245.150) está presente somente nos epimastigotas resistentes, e a peroxina PEX-12 (Tc00.1047053503641.19), envolvida com a importação de proteínas para a matriz de glicossomos, organelas relacionadas aos peroxissomos de outros eucariotos (Saveria et al., 2007), está presente somente nos epimastigotas Controle.

De maneira geral, a análise proteômica sugere que o tratamento com GIB-24 causa alterações na função mitocondrial, gera estresse oxidativo e influência no metabolismo de açúcares, aminoácidos e lipídeos. É provável que as outras proteínas identificadas estejam envolvidas também nessas vias ou em resposta ao estresse ocasionado por essas alterações.

Tabela 4.16. Enriquecimento de termos GOBP – classe de ontologia gênica de funções biológicas

ID	Nome	Nº genes bckd	Nº Genes Amostra	% genes amostra no bckd	% genes amostra/ % genes bckd	Valor-p	Benjamini	Bonferroni	
1	GO:0008150	Biological process	2	22	1100.0	1828.57	7,38E-41	3,32E-39	3,32E-39
2	GO:0044699	Single-organism process	1238	17	1.4	2.28	0.00020765046633	0.00467213549243	0.00934427098487
3	GO:1901657	Glycosyl compound metabolic process	73	4	5.5	9.11	0.00103852347791	0.012383261998	0.0467335565061
4	GO:0044710	Single-organism metabolic process	660	11	1.7	2.77	0.00110073439982	0.012383261998	0.0495330479918
5	GO:1901135	Carbohydrate derivative metabolic process	142	5	3.5	5.85	0.00159050444261	0.0143145399835	0.0715726999173
6	GO:0044281	Small molecule metabolic process	319	7	2.2	3.65	0.00253869354468	0.0190402015851	0.114241209511
7	GO:0055086	Nucleobase-containing small molecule metabolic process	128	4	3.1	5.19	0.00738055205153	0.0308691104526	0.332124842319
8	GO:0044711	Single-organism biosynthetic process	210	5	2.4	3.96	0.00818155622205	0.0308691104526	0.368170029992
9	GO:0009116	Nucleoside metabolic process	71	3	4.2	7.02	0.00939902996143	0.0308691104526	0.422956348265
10	GO:0006839	Mitochondrial transport	23	2	8.7	14.46	0.00952186189805	0.0308691104526	0.428483785412
11	GO:0045454	Cell redox homeostasis	25	2	8.0	13.3	0.0110584293819	0.0308691104526	0.497629322184
12	GO:0015886	Heme transport	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0308691104526	0.536614505899

13	GO:0046500	S-adenosylmethionine metabolic process	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0308691104526	0.536614505899
14	GO:0006556	S-adenosylmethionine biosynthetic process	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0308691104526	0.536614505899
15	GO:1901678	Iron coordination entity transport	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0308691104526	0.536614505899
16	GO:0046129	Purine ribonucleoside biosynthetic process	27	2	7.4	12.31	0.0126969741634	0.0308691104526	0.571363837352
17	GO:0042451	Purine nucleoside biosynthetic process	27	2	7.4	12.31	0.0126969741634	0.0308691104526	0.571363837352
18	GO:0009108	Coenzyme biosynthetic process	28	2	7.1	11.87	0.013553710562	0.0308691104526	0.609916975289
19	GO:0051188	Cofactor biosynthetic process	32	2	6.3	10.39	0.0172232952482	0.0308691104526	0.775048286167
20	GO:0042455	Ribonucleoside biosynthetic process	32	2	6.3	10.39	0.0172232952482	0.0308691104526	0.775048286167
21	GO:0019725	Cellular homeostasis	32	2	6.3	10.39	0.0172232952482	0.0308691104526	0.775048286167
22	GO:0072522	Purine-containing compound biosynthetic process	32	2	6.3	10.39	0.0172232952482	0.0308691104526	0.775048286167
23	GO:0009163	Nucleoside biosynthetic process	32	2	6.3	10.39	0.0172232952482	0.0308691104526	0.775048286167
24	GO:1901659	Glycosyl compound	32	2	6.3	10.39	0.0172232952482	0.0308691104526	0.775048286167

		biosynthetic process							
25	GO:0016137	Glycoside metabolic process	2	1	50.0	83.12	0.0178354860393	0.0308691104526	0.802596871766
26	GO:0006011	UDP-glucose metabolic process	2	1	50.0	83.12	0.0178354860393	0.0308691104526	0.802596871766
27	GO:0006118	Obsolete electron transport	38	2	5.3	8.75	0.0234229226864	0.0379987150132	1.0
28	GO:0006730	One-carbon metabolic process	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.0379987150132	1.0
29	GO:0006811	Ion transport	103	3	2.9	4.84	0.0246100677853	0.0379987150132	1.0
30	GO:0001676	Long-chain fatty acid metabolic process	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0379987150132	1.0
31	GO:0006744	Ubiquinone biosynthetic process	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0379987150132	1.0
32	GO:0042759	Long-chain fatty acid biosynthetic process	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0379987150132	1.0
33	GO:0051181	Cofactor transport	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0379987150132	1.0
34	GO:1901663	Quinone biosynthetic process	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0379987150132	1.0
35	GO:0042181	Ketone biosynthetic process	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0379987150132	1.0
36	GO:0055114	Oxidation-reduction process	202	4	2.0	3.29	0.0327713377712	0.0409641722141	1.0
37	GO:0009225	Nucleotide-sugar metabolic process	5	1	20.0	33.25	0.0353632878284	0.0413664697404	1.0
38	GO:0042592	Homeostatic process	48	2	4.2	6.93	0.0354581004994	0.0413664697404	1.0
39	GO:0009165	Nucleotide biosynthetic process	49	2	4.1	6.79	0.0367701953248	0.0413664697404	1.0

40	GO:1901293	Nucleoside phosphate biosynthetic process	49	2	4.1	6.79	0.0367701953248	0.0413664697404	1.0
41	GO:0034654	Nucleobase-containing compound biosynthetic process	124	3	2.4	4.02	0.0391132149462	0.0429291383556	1.0
42	GO:1901661	Quinone metabolic process	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0430518169348	1.0
43	GO:0006743	Ubiquinone metabolic process	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0430518169348	1.0
44	GO:0042180	Cellular ketone metabolic process	7	1	14.3	23.75	0.0468800890588	0.0479455456283	1.0
45	GO:0019438	Aromatic compound biosynthetic process	135	3	2.2	3.69	0.0481271742328	0.0481271742328	1.0

ID = Identificação no *Gene Ontology Consortium*

Bckd = *background*, refere-se a todos genes que pertencem a essa anotação (via, função) específica

Tabela 4.17. Enriquecimento de termos GOCC – classe de ontologia gênica de componentes celulares.

ID	Nome	N° genes bckd	N° Genes Amostra	% genes amostra no bckd	% genes amostra/ % genes bckd	Valor-p	Benjamini	Bonferroni
1	GO:0005575 Cellular component	1	17	1700.0	2825.97	9,72E-29	4,28E-27	4,28E-27
2	GO:0044425 Membrane part	468	11	2.4	3.91	5,43E+06	0.000831118072105	0.00239086835869
3	GO:0016021 Integral component of membrane	390	10	2.6	4.26	6,51E+05	0.000831118072105	0.00286591012919
4	GO:0031224 Intrinsic component of membrane	397	10	2.5	4.19	7,56E+06	0.000831118072105	0.00332447228842
5	GO:0098588 Bounding membrane of organelle	128	6	4.7	7.79	0.000113678056542	0.00100036689757	0.00500183448784
6	GO:0098805 Whole membrane	99	5	5.1	8.4	0.00032792182622	0.00240476005895	0.0144285603537
7	GO:0031090 Organelle membrane	166	6	3.6	6.01	0.000445167763751	0.00279819737215	0.019587381605
8	GO:0031301 Integral component of organelle membrane	24	3	12.5	20.78	0.000512395363813	0.00281817450097	0.0225453960078
9	GO:0046930 Pore complex	5	2	40.0	66.49	0.000712597708431	0.00320387480741	0.031354299171
10	GO:0031300 Intrinsic component of organelle membrane	30	3	10.0	16.62	0.000932912749701	0.00320387480741	0.0410481609868
11	GO:0031307 Integral component of	6	2	33.3	55.41	0.000946599374915	0.00320387480741	0.0416503724963

		mitochondrial outer membrane							
12	GO:0032592	Integral component of mitochondrial membrane	6	2	33.3	55.41	0.000946599374915	0.00320387480741	0.0416503724963
13	GO:0031306	Intrinsic component of mitochondrial outer membrane	6	2	33.3	55.41	0.000946599374915	0.00320387480741	0.0416503724963
14	GO:0098573	Intrinsic component of mitochondrial membrane	7	2	28.6	47.5	0.00121253493107	0.00381082406907	0.0533515369669
15	GO:0016020	Membrane	797	12	1.5	2.5	0.00146373184416	0.00429361340954	0.0644042011431
16	GO:0009898	Cytoplasmic side of plasma membrane	10	2	20.0	33.25	0.00219831313915	0.00604536113267	0.0967257781227
17	GO:0098562	Cytoplasmic side of membrane	11	2	18.2	30.22	0.00258836722341	0.00669930340177	0.11388815783
18	GO:0098552	Side of membrane	14	2	14.3	23.75	0.00393797269665	0.0096261554807	0.173270798653
19	GO:0005741	Mitochondrial outer membrane	54	3	5.6	9.24	0.00454223838872	0.00999591774368	0.199858489104
20	GO:0031968	Organelle outer membrane	55	3	5.5	9.07	0.00477077892312	0.00999591774368	0.209914272617
21	GO:0019867	Outer membrane	55	3	5.5	9.07	0.00477077892312	0.00999591774368	0.209914272617
22	GO:0020022	Acidocalcisome	17	2	11.8	19.56	0.00554948255855	0.0110989651171	0.244177232576
23	GO:0016281	Eukaryotic translation initiation factor 4F complex	21	2	9.5	15.83	0.00808979634419	0.0154761321367	0.355951039144
24	GO:0044455	Mitochondrial membrane part	28	2	7.1	11.87	0.013553710562	0.0248484693636	0.596363264727

25	GO:0098796	Membrane protein complex	88	3	3.4	5.67	0.0164548148895	0.0281903606706	0.724011855138
26	GO:0031966	Mitochondrial membrane	89	3	3.4	5.6	0.0169415567532	0.0281903606706	0.745428497142
27	GO:0046611	Lysosomal proton-transporting V-type atpase complex	2	1	50.0	83.12	0.0178354860393	0.0281903606706	0.784761385727
28	GO:0005740	Mitochondrial envelope	91	3	3.3	5.48	0.0179393204268	0.0281903606706	0.789330098778
29	GO:0044459	Plasma membrane part	37	2	5.4	8.99	0.0223338946185	0.029809395102	0.982691363213
30	GO:0031967	Organelle envelope	100	3	3.0	4.99	0.0228320661229	0.029809395102	1.0
31	GO:0031975	Envelope	100	3	3.0	4.99	0.0228320661229	0.029809395102	1.0
32	GO:0005765	Lysosomal membrane	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.029809395102	1.0
33	GO:0098852	Lytic vacuole membrane	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.029809395102	1.0
34	GO:0000323	Lytic vacuole	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.029809395102	1.0
35	GO:0005764	Lysosome	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.029809395102	1.0
36	GO:0033180	Proton-transporting V-type atpase, V1 domain	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.0361222352595	1.0
37	GO:0020015	Glycosome	46	2	4.3	7.23	0.0328910259155	0.0391136524401	1.0
38	GO:0043231	Intracellular membrane-bounded organelle	915	10	1.1	1.82	0.0370624161404	0.041328800425	1.0
39	GO:0043227	Membrane-bounded organelle	917	10	1.1	1.81	0.0375624225665	0.041328800425	1.0
40	GO:0005783	Endoplasmic reticulum	51	2	3.9	6.52	0.0394502185875	0.041328800425	1.0

41	GO:0005777	Peroxisome	51	2	3.9	6.52	0.0394502185875	0.041328800425	1.0
42	GO:0042579	Microbody	51	2	3.9	6.52	0.0394502185875	0.041328800425	1.0
43	GO:0005886	Plasma membrane	54	2	3.7	6.16	0.0436060590598	0.0446201534565	1.0
44	GO:0046860	Glycosome membrane	7	1	14.3	23.75	0.0468800890588	0.0468800890588	1.0

Tabela 4.18. Enriquecimento de termos GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares.

ID	Nome	Nº genes bckd	Nº Genes Amostra	% genes amostra no bckd	% genes amostra/ % genes bckd	Valor-p	Benjamini	Bonferroni	
1	GO:0015288	porin activity	5	2	40.0	66.49	0.000712597708431	0.0161789969368	0.0534448281323
2	GO:0022829	wide pore channel activity	5	2	40.0	66.49	0.000712597708431	0.0161789969368	0.0534448281323
3	GO:0005253	anion channel activity	7	2	28.6	47.5	0.00121253493107	0.0161789969368	0.09094011983
4	GO:0008308	voltage-gated anion channel activity	7	2	28.6	47.5	0.00121253493107	0.0161789969368	0.09094011983
5	GO:0022857	transmembrane transporter activity	138	5	3.6	6.02	0.00140624635924	0.0161789969368	0.105468476943
6	GO:0005244	voltage-gated ion channel activity	8	2	25.0	41.56	0.0015100397141	0.0161789969368	0.113252978558
7	GO:0022832	voltage-gated channel activity	8	2	25.0	41.56	0.0015100397141	0.0161789969368	0.113252978558
8	GO:0016684	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	11	2	18.2	30.22	0.00258836722341	0.0175519674068	0.194127541756
9	GO:0042626	ATPase activity, coupled to transmembrane	47	3	6.4	10.61	0.00312953451055	0.0175519674068	0.234715088291

		movement of substances							
10	GO:0043492	ATPase activity, coupled to movement of substances	47	3	6.4	10.61	0.00312953451055	0.0175519674068	0.234715088291
11	GO:0016820	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances	48	3	6.3	10.39	0.00331177728239	0.0175519674068	0.24838329618
12	GO:0005215	transporter activity	172	5	2.9	4.83	0.00359183554875	0.0175519674068	0.269387666157
13	GO:0015405	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	50	3	6.0	9.97	0.00369555627568	0.0175519674068	0.277166720676
14	GO:0015399	primary active transmembrane transporter activity	50	3	6.0	9.97	0.00369555627568	0.0175519674068	0.277166720676
15	GO:0022836	gated channel activity	14	2	14.3	23.75	0.00393797269665	0.0175519674068	0.295347952249
16	GO:0022803	passive transmembrane transporter activity	15	2	13.3	22.16	0.00444649840972	0.0175519674068	0.333487380729
17	GO:0005216	ion channel activity	15	2	13.3	22.16	0.00444649840972	0.0175519674068	0.333487380729
18	GO:0015267	channel activity	15	2	13.3	22.16	0.00444649840972	0.0175519674068	0.333487380729
19	GO:0022838	substrate-specific channel activity	15	2	13.3	22.16	0.00444649840972	0.0175519674068	0.333487380729
20	GO:0005524	ATP binding	578	9	1.6	2.59	0.00572025153967	0.0208973306467	0.429018865475
21	GO:0032559	adenyl ribonucleotide binding	580	9	1.6	2.58	0.00585125258108	0.0208973306467	0.438843943581
22	GO:0030554	adenyl nucleotide binding	590	9	1.5	2.54	0.00654222106137	0.0216042603038	0.490666579603

23	GO:0022892	substrate-specific transporter activity	124	4	3.2	5.36	0.00662530649315	0.0216042603038	0.496897986986
24	GO:0016209	antioxidant activity	21	2	9.5	15.83	0.00808979634419	0.024423908161	0.606734725814
25	GO:0042623	ATPase activity, coupled	132	4	3.0	5.04	0.00819105286217	0.024423908161	0.614328964663
26	GO:0003824	catalytic activity	1999	19	1.0	1.58	0.00872404075134	0.024423908161	0.65430305635
27	GO:0008509	anion transmembrane transporter activity	22	2	9.1	15.11	0.00879260693796	0.024423908161	0.659445520347
28	GO:0022804	active transmembrane transporter activity	73	3	4.1	6.83	0.0101115821853	0.0255530717095	0.7583686639
29	GO:0046906	tetrapyrrole binding	24	2	8.3	13.85	0.0102772416767	0.0255530717095	0.770793125754
30	GO:0020037	heme binding	24	2	8.3	13.85	0.0102772416767	0.0255530717095	0.770793125754
31	GO:0004478	methionine adenosyltransferase activity	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0255530717095	0.894357509832
32	GO:0090556	phosphatidylserine-translocating ATPase activity	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0255530717095	0.894357509832
33	GO:0003983	UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0255530717095	0.894357509832
34	GO:0016639	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, NAD or NADP as acceptor	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0255530717095	0.894357509832
35	GO:0051748	UTP-monosaccharide-1-phosphate uridylyltransferase activity	1	1	100.0	166.23	0.0119247667978	0.0255530717095	0.894357509832

36	GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	676	9	1.3	2.21	0.0154758951578	0.0288271375636	1.0
37	GO:0001883	purine nucleoside binding	677	9	1.3	2.21	0.0156168792474	0.0288271375636	1.0
38	GO:0032550	purine ribonucleoside binding	677	9	1.3	2.21	0.0156168792474	0.0288271375636	1.0
39	GO:0032549	ribonucleoside binding	678	9	1.3	2.21	0.0157588352014	0.0288271375636	1.0
40	GO:0032555	purine ribonucleotide binding	678	9	1.3	2.21	0.0157588352014	0.0288271375636	1.0
41	GO:0001882	nucleoside binding	678	9	1.3	2.21	0.0157588352014	0.0288271375636	1.0
42	GO:0032553	ribonucleotide binding	687	9	1.3	2.18	0.0170808462454	0.0290795968031	1.0
43	GO:0097367	carbohydrate derivative binding	688	9	1.3	2.17	0.0172327453098	0.0290795968031	1.0
44	GO:0017076	purine nucleotide binding	689	9	1.3	2.17	0.0173856611071	0.0290795968031	1.0
45	GO:0004731	purine-nucleoside phosphorylase activity	2	1	50.0	83.12	0.0178354860393	0.0290795968031	1.0
46	GO:0043141	ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity	2	1	50.0	83.12	0.0178354860393	0.0290795968031	1.0
47	GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	93	3	3.2	5.36	0.0189695432331	0.0302705477125	1.0
48	GO:0016887	ATPase activity	181	4	2.2	3.67	0.0231705380276	0.0342000271603	1.0
49	GO:0042802	identical protein binding	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.0342000271603	1.0
50	GO:0042803	protein homodimerization activity	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.0342000271603	1.0

51	GO:0030508	obsolete thiol-disulfide exchange intermediate activity	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.0342000271603	1.0
52	GO:0043139	5'-3' DNA helicase activity	3	1	33.3	55.41	0.0237120188312	0.0342000271603	1.0
53	GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	110	3	2.7	4.53	0.0290452425685	0.041047994613	1.0
54	GO:0009922	fatty acid elongase activity	4	1	25.0	41.56	0.0295545561214	0.041047994613	1.0
55	GO:0043168	anion binding	756	9	1.2	1.98	0.0301574752712	0.0411238299152	1.0
56	GO:1901265	nucleoside phosphate binding	767	9	1.2	1.95	0.0327743046602	0.0431240850792	1.0
57	GO:0000166	nucleotide binding	767	9	1.2	1.95	0.0327743046602	0.0431240850792	1.0
58	GO:0036094	small molecule binding	777	9	1.2	1.93	0.0352920459548	0.0442041097856	1.0
59	GO:0004749	ribose phosphate diphosphokinase activity	5	1	20.0	33.25	0.0353632878284	0.0442041097856	1.0
60	GO:0070569	uridylyltransferase activity	5	1	20.0	33.25	0.0353632878284	0.0442041097856	1.0
61	GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	49	2	4.1	6.79	0.0367701953248	0.0448401027055	1.0
62	GO:0016740	transferase activity	657	8	1.2	2.02	0.0370678182366	0.0448401027055	1.0
63	GO:0004012	phospholipid-translocating ATPase activity	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0453732384361	1.0
64	GO:0016864	intramolecular oxidoreductase activity, transposing S-S bonds	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0453732384361	1.0
65	GO:0016778	diphosphotransferase activity	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0453732384361	1.0

66	GO:0008553	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0453732384361	1.0
67	GO:0004312	fatty acid synthase activity	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0453732384361	1.0
68	GO:0003756	protein disulfide isomerase activity	6	1	16.7	27.71	0.0411384028488	0.0453732384361	1.0
69	GO:0017111	nucleoside- triphosphatase activity	327	5	1.5	2.54	0.0446999089107	0.0481644750604	1.0
70	GO:0015042	trypanothione- disulfide reductase activity	7	1	14.3	23.75	0.0468800890588	0.0481644750604	1.0
71	GO:0004601	peroxidase activity	7	1	14.3	23.75	0.0468800890588	0.0481644750604	1.0
72	GO:0051920	peroxiredoxin activity	7	1	14.3	23.75	0.0468800890588	0.0481644750604	1.0
73	GO:0005548	phospholipid transporter activity	7	1	14.3	23.75	0.0468800890588	0.0481644750604	1.0
74	GO:0016462	pyrophosphatase activity	335	5	1.5	2.48	0.0487243426072	0.0493827796695	1.0
75	GO:0016818	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus- containing anhydrides	337	5	1.5	2.47	0.0497638220955	0.0497638220955	1.0

Tabela 4.19. Proteínas identificadas com diferenças significativas de expressão entre epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24 e Controle (selvagem).

	LFQ intensity Controle #1	LFQ intensity Controle #2	LFQ intensity GIB-24 #1	LFQ intensity GIB-24 #2	Peptídeos únicos	Diferença de intensidade média (Log2)	Diferença de intensidade média (Fold change)	ID	Função/ Domínio Identificados
1	23,166	23,5752	24,73	24,501	3	1,24472046	2,369726	Tc00.1047053410243.10	Hipotética, conservada; Sem domínios
2	22,578	23,0876	23,96	24,116	7	1,20545197	2,306095	Tc00.1047053508797.29	Hipotética, conservada; BOP1NT (NUC169), domínio WD, repetição G-beta
3	23,578	23,8362	24,907	24,857	4	1,1748867	2,257751	Tc00.1047053418221.30	Hipotética, conservada; Domínio LRR_6
4	25,233	25,2716	23,747	23,847	4	-1,4553089	0,364677	Tc00.1047053504933.10	Calpaína- <i>-like</i> , cisteína peptidase, putativo
5	25,619	25,493	27,048	27,223	7	1,57958221	2,988833	Tc00.1047053503679.10	Aspartato-aminotransferase, putativa; Aminotransferase classe I e II
6	21,257	21,4963	23,315	22,768	3	1,66521072	3,1716	Tc00.1047053509791.120	Proteína associada a cinetoplasto; KAP6
7	21,393	21,635	22,422	22,833	4	1,1133461	2,163468	Tc00.1047053508649.20; Tc00.1047053509499.38	Hipotética, conservada; Sem domínios

8	23,169	24,1992	26,048	26,538	1	2,60896683	6,100666	Tc00.1047053503893.100; Tc00.1047053508507.40	Hipotética, conservada ; Domínio Barril A/B responsivo ao stress
9	25,558	25,0828	26,961	27,121	1	1,72097588	3,296593	Tc00.1047053504069.70; Tc00.10470	ATP sintase vacuolar, putativa; Domínio ATP sintase subunidade C
10	20,626	20,5257	21,578	21,884	2	1,15463066	2,226273	Tc00.1047053504163.70; Tc00.1047053510301.40	Hipotética, conservada; Domínio SIP-1
11	24,986	24,4633	26,217	25,905	11	1,33633804	2,525096	Tc00.1047053509859.40; Tc00.104	Leucil aminopeptidase citosólica, putativo; Domínio catalítico da família das aminopeptidases citosólicas
12	30,873	30,7825	29,77	29,79	23	-1,0477486	0,483722	Tc00.1047053508111.30; Tc00.1047053507875.20	Glutamato desidrogenase, putativa; Domínio da família das ELFV desidrogenases
13	24,58	24,3621	23,311	23,492	4	-1,0694408	0,476504	Tc00.1047053508153.994	Citocromo c oxidase cobre chaperona, putativa; Domínio COX17
14	26,525	26,4716	25,179	25,501	5	-1,1584854	0,447983	Tc00.1047053507715.34; Tc00.10470 53511115.30	Hipotética, conservada; Sem domínios
15	25,395	24,9233	23,521	23,957	4	-1,4199409	0,373728	Tc00.1047053508257.70; Tc00.104	Proteína fosfomanomutase (- <i>like</i>), putativa; Domínios PGM_PMM_I, II, III e IV

16	22,46	22,5805	23,915	23,807	6	1,34073639	2,532806	Tc00.1047053504425.70; Tc00.1047053509331.200	Transportador-ABC, putativa; Domínio de ligação de ATP em transportadores ABC e domínio Transportador de cassete de ligação a ATP
17	24,977	25,196	23,754	23,931	2	-1,2442455	0,422129	Tc00.1047053506753.130	Hipotética, conservada; Domínio Rhodanese-like (Tiosulfato sulfurtransferase)
18	23,245	23,6587	24,517	24,693	7	1,1534729	2,224487	Tc00.1047053511181.20	Hipotética, conservada; Domínio tioredoxina
19	22,872	22,5021	23,987	24,148	3	1,3806076	2,60378	Tc00.1047053506577.70; Tc00.1047053507709.70	Hipotética, conservada; Domínio TPR-like
20	20,364	20,0909	22,044	21,807	3	1,69807434	3,244676	Tc00.1047053507011.130	Hipotética, conservada; Domínio heme-peroxidases
21	23,319	23,65	25,128	24,772	3	1,46599007	2,76253	Tc00.1047053506859.90; Tc00.1047053511815.60	Pré-dobramento, putativa
22	22,377	22,8203	23,616	23,814	1	1,11591911	2,16733	Tc00.1047053511751.160	Hipotética, conservada; Domínio CRAL-TRIO
23	29,441	29,0522	27,989	27,918	11	-1,2934914	0,407963	Tc00.1047053511277.60; Tc00.1047053506357.50	Alcool desidrogenase, putativa; Domínio Fe_ADH
24	28,495	28,7147	27,222	26,874	13	-1,5565605	0,339961	Tc00.1047053506559.410	Hipotética, conservada; Domínio Amino-transferase classe IV

5. DISCUSSÃO

5.1. AZLACTONAS

Os derivados de oxazolonas têm um amplo espectro de atividades biológicas (Bala et al 2011; Sharma et al 2015), incluindo atividades antimicrobiana (Desai et al, 2009; Siddiqui et al 2001), anti-fúngica (Bala et al 2012; Desai et al 2009) e anti-câncer (Han et al 2005; Jat et al 2012). No entanto, em nosso conhecimento esta é a primeira vez que azlactonas são testados contra um tripanosomatídeo patogênico.

Nossos dados mostraram que EPA-35 foi mais seletivo em formas amastigotas intracelulares que em epimastigotas de *T. cruzi* (Tab 4.7). Um aumento na seletividade de óleos essenciais em relação aos amastigotas já foi demonstrado (Medeiros et al 2011, Santoro et al 2007c), destacando a necessidade de avaliar os compostos candidatos em amastigotas, formas clinicamente mais relevantes. No que se refere à estrutura química dos quatro análogos de azlactona sintetizados, a presença de um grupo metilo no centro estereogênico (substituição C-4) e uma ligação dupla conjugada parece crucial para a atividade biológica mais elevada de EPA-35. As oxazolonas são utilizadas na fabricação de vários fármacos biologicamente ativos e a substituição de um grupo funcional nas posições C-4 e C-2 é vital na atividade destes compostos (Bala et al., 2011). Esperava-se que as quatro azlactonas aqui utilizadas apresentassem uma maior extensão de conjugação, devido à presença de uma ligação dupla adicional externa ao anel heterocíclico. A melhor atividade de EPA-35 pode ser atribuída à sua conjugação mais elevada e a uma conformação molecular mais apropriada devido à presença de um grupo metilo como cadeia lateral. Foi demonstrado que as azlactonas apresentam potencial mutagenico na síntese de DNA (Duarte et al., 2000) e são potentes inibidores da metionil-RNA-sintetase (Tandon et al., 2004). Portanto, EPA-35 poderia estar agindo sobre a síntese de DNA dos parasitas ou a síntese de proteínas dos parasitas tratados. Entretanto, não foi possível observar alterações no ciclo celular de epimastigotas tratados (4.1.2.1.8.).

As terapias que combinam compostos tem sido cada vez mais defendidas como forma de aumentar a eficácia e a tolerância no tratamento da doença de Chagas (Diniz et al., 2013; Planer et al., 2014). A combinação de drogas de diferentes classes químicas pode reduzir as doses de droga e/ou a duração do tratamento, o que resultaria em menos efeitos secundários, custos reduzidos e melhor eficácia no tratamento de infecções por *T. cruzi* agudas com risco de vida nos seres humanos, tais como as de administração oral,

congenita ou infecções por reativação em pacientes chagásicos (Martins et al., 2015). Entretanto, ao se avaliar o uso combinado de EPA-35 com benzonidazol (BZN), fármaco referência no tratamento de doença de Chagas, observou-se que a maioria das combinações de EPA-35 com BZN tem uma relação antagônica, de acordo com os Índices de Combinação (*Combination Index* = CI) obtidos a partir dos dados experimentais (Tab 4.8), os quais são uma medida quantitativa do grau de interação da droga em termos de sinergia e antagonismo (Chou e Talalay, 1981). Os valores de CI encontrados foram superiores a 1 indicando que EPA-35 não deve ser utilizado para um possível tratamento combinatório com BZN, e vice-versa, com sua atual estrutura química. Alterações na estrutura química de EPA-35 poderiam levar a síntese de compostos viáveis para este tipo de tratamento e constituem uma possível direção em estudos posteriores.

O tratamento por 72 horas com concentrações até 30 μ M de EPA-35 em células Vero infectadas com *T. cruzi* Dm28c levou a uma diminuição dose-dependente na contagem média de parasitas, mas a relação % amastigotas/% tripomastigotas permaneceu constante, indicando que o efeito foi sobre o crescimento de amastigotas, mas não sobre a diferenciação. A falta de atividade de EPA-35 sobre formas tripomastigotas tratadas, mesmo que por tempo reduzido (4 horas), reforça que possivelmente EPA-35 é menos ativo sobre formas tripomastigotas que em formas amastigotas intracelulares. A avaliação de citotoxicidade em células Vero após 72 horas de tratamento com EPA-35 resultou num valor $CC_{50/72h}$ de 404,6 μ M, ao passo que BZN não induz citotoxicidade em concentrações até 3842,70 μ M ($CC_{50/72h}$). Portanto, a diminuição dose-dependente no número médio de parasitas presente no sobrenadante de culturas infectadas não pode ser atribuída a citotoxicidade nas células hospedeiras.

A análise do ciclo de divisão celular por citometria de fluxo com epimastigotas (formas proliferativas de *T. cruzi*, como amastigotas) mostrou que EPA-35 não parou o ciclo celular em qualquer fase após 24h de tratamento, indicando que a divisão celular não é afetada (Fig 4.7). Entretanto, a quantidade de epimastigotas submetida a um tratamento por 24 horas mostra a existência de redução no número de células (Fig 4.2). Estas observações sugerem que EPA-35 tem ação tripanocida, e não uma ação tripanostática, sobre epimastigotas e também sobre amastigotas promovendo a diminuição no número de tripomastigotas / amastigotas no sobrenadante de culturas de células Vero infectadas.

A análise de epimastigotas tratados com EPA-35 por 24 horas e depois corados com Rhodamine 123 mostrou uma alteração significativa no potencial de membrana mitocondrial medido por citometria de fluxo (Fig 4.8), indicando que EPA-35 atua sobre a mitocôndria do parasita. Além disso, a falta de marcação na avaliação com PI indica que a membrana do parasita se manteve intacta. Os tripanosomatídeos têm de manter o potencial transmembranar de uma única mitocôndria para sua sobrevivência (Garcia et al., 2013; Menna-Barreto e Castro 2014), o que torna esta organela um importante alvo terapêutico. No entanto, não é possível excluir a possibilidade que esta atividade sobre a mitocôndria é um efeito secundário do composto, devido à ação em algum outro alvo.

A morfologia de parasitas tratados com EPA-35 mostrou-se alterada quando observadas por MEV, com forma diminuída e arredondada. Esta diminuição no tamanho celular foi confirmada por citometria de fluxo, onde foi possível observar que a porcentagem de células com tamanho menor que as encontradas no controle (não tratado) foi de cerca de 8 vezes maior (Fig 4.5; Tab 4.9). Possivelmente ocorrem algumas alterações de citoesqueleto nos parasitas tratados, resultando em perda da morfologia normal com aparência arredondada/enrugada, o que leva à diminuição do tamanho celular. Tal hipótese se deve à observação de que poros na membrana plasmática não foram detectados por citometria de fluxo (PI) ou MEV e, portanto, não houve extravasamento citoplasmático.

A falta de coloração com PI, adicionada à diminuição do tamanho celular e da ruptura ψ_m , podem indicar a apoptose como mecanismo de morte celular (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Proto et al., 2013). No entanto, tem sido sugerido que a morte celular em protozoários parasitas deve ser classificada como necrose não regulada ou morte celular incidental, uma vez que não há receptores de morte e vias de sinalização consistentes com qualquer tipo de morte celular programada e eficientemente comprovados nesses organismos (Proto et al., 2013).

Em conclusão, os nossos dados indicam que o derivado de azlactona EPA-35 foi ativo contra *Trypanosoma cruzi*. Embora isto não justifique o uso clínico na forma atual de EPA-35, este é um composto promissor para avaliação adicional contra este parasita devido a sua ação seletiva nas formas amastigotas intracelulares. Estudos adicionais sobre a transformação sintética de EPA-35 em outros derivados podem produzir um composto com citotoxicidade reduzida e atividade aumentada contra *T. cruzi*.

5.2. DIAMINAS

Dentre as diaminas terpênicas avaliadas apenas tres apresentam atividade seletiva em formas epimastigotas de *T. cruzi*: GSC-01 (IS = 17,86), GIB-24 (IS=16,4) e CGE (IS= 8,39). Estas foram selecionadas para avaliação em amastigotas, nas quais apenas CGE foi mais seletiva. Nestas duas formas evolutivas de *T. cruzi*, o Benzonidazol - fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas - apresentou alta seletividade tanto em epimastigotas quanto em amastigotas (IS = 223,68 e 264,46, respectivamente).

O uso combinado de GIB-24 e benzonidazol (BZN) resultou em uma relação de antagonismo, de acordo com os Índices de Combinação (*Combination Index* = CI) obtidos a partir dos dados experimentais, os quais são uma medida quantitativa do grau de interação da droga em termos de sinergia e antagonismo (Chou e Talalay, 1981). Os valores de CI encontrados foram superiores a 1 indicando que GIB-24 não deve ser utilizado para um possível tratamento combinatório com BZN. Alterações na estrutura química de GIB-24 poderiam levar a síntese de compostos viáveis para este tipo de tratamento e constituem uma possível direção em estudos posteriores.

Ao tratar células Vero infectadas com GIB-24 foi possível observar que o composto não impediu que o ciclo intracelular se completasse, ocorrendo a liberação de tripomastigotas e amastigotas no sobrenadante das culturas no quarto dia de infecção (96 horas), após 72 horas de tratamento. Entretanto, o tratamento levou a uma diminuição significativa da quantidade de parasitas (tripomastigotas + amastigotas) presentes no sobrenadante em todas as concentrações avaliadas, indicando que GIB-24 atua sobre os parasitas intracelulares possivelmente causando a morte celular da maioria destes.

A morte de amastigotas intracelulares levou à uma redução no número de parasitas liberados no meio extracelular. Nossos dados mostraram um aumento dose-dependente na porcentagem de amastigotas no sobrenadante (Fig 4.15; Tab 4.13). O processo de amastigogênese (diferenciação de tripomastigotas em amastigotas) resulta de uma relação entre mudanças ambientais e ajuste da expressão dos genes, a qual desencadeia tal processo, e pode ser mimetizado *in vitro* através da exposição dos parasitos ao baixo pH. Este modelo vem sendo utilizado tanto para o *T. cruzi* (Hernandez-Osório et al., 2010; Pucci, 2009; Queiroz et al., 2014) quanto para parasitos do gênero *Leishmania* (Burchmore e Barret, 2001; Pucci, 2009). Entretanto, nenhuma alteração significativa no pH foi observada tanto em meio de cultura (DMEM) puro incubado com GIB-24 quanto em meio de cultura contendo células Vero infectadas ou não e tratadas com GIB-24 por

48 horas (Fig 4.16), excluindo assim a hipótese de amastigogênese induzida por alteração de pH e indicando assim que o aumento significativo da porcentagem relativa de amastigotas em relação a tripomastigotas ocorreu devido a uma ação direta do composto no parasita liberado. Ainda, o mesmo efeito (aumento na porcentagem de amastigotas) foi observado quando tratou-se tripomastigotas por tempo reduzido (4 horas), o que corrobora a hipótese de que GIB-24 induziu a amastigogênese. Entretanto não há como excluir a possibilidade de que o aumento de amastigotas presentes no sobrenadante de infecções tratadas com GIB-24 (4.1.2.2.6) possa ser um efeito de bloqueio na diferenciação de amastigotas em tripomastigotas, prévia a lise das células hospedeiras (células Vero), o que levaria ao aumento de amastigotas observado no sobrenadante de infecções tratadas.

De acordo com o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD), o termo apoptose descreve um processo de morte celular com aspecto morfológico específico. Alterações celulares durante este processo incluem arredondamento da célula, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de bolhas na membrana plasmática (*blebs*) e, se no contexto certo, engolfamento por fagócitos residentes. Pouca ou nenhuma modificação ultra-estrutural de organelas citoplasmáticas é observada durante a apoptose (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Debrabant et al., 2003). Além destas características morfológicas, marcadores bioquímicos deste tipo de morte celular incluem a dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), a liberação de citocromo c, exposição de fosfatidilserina (PS) no folheto externo da membrana plasmática e manutenção de uma membrana plasmática intacta até fases tardias do processo (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Smirlis e Soteriadou, 2011).

Em condições fisiológicas normais a fosfatidilserina (PS) está localizada predominantemente no folheto interno da membrana plasmática. A anexina-V é uma proteína que se liga à PS exposta na superfície de membranas plasmáticas de células em processo inicial de apoptose, mas podendo ligar-se também a PS na face interna da membrana plasmática de células em processo tardio de apoptose, no caso de células que já possuam poros na membrana plasmática (Jiménez-Ruiz et al., 2010). O iodeto de propídio somente irá marcar o DNA daquelas células que tiverem alguma descontinuidade de membrana plasmática. Isto ocorrerá tanto em células em apoptose tardia, quanto em células necróticas.

Já a morte celular por necrose é classicamente definida como morte celular prematura, que ocorre sem marcadores moleculares e morfológicos de apoptose ou

autofagia (Proto et al., 2013). É caracterizada morfológicamente por um aumento no volume celular (oncoze), inchaço de organelas, condensação moderada de cromatina, ruptura da membrana plasmática e a subsequente perda de conteúdo intracelular (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Lüder et al., 2010; Proto et al., 2013). A ausência aparente de regulação molecular está de acordo com o entedimento de que tais processos são passivos e podem ser considerados, em certa medida, como puramente descontrolados ou acidentais, por isso chamados de necrose acidental ou não regulada. No entanto, tem-se encontrado necrose regulada envolvendo a sinalização por receptor de morte e inibição da caspase, culminando em morte celular com características morfológicas necróticas (Proto et al., 2013).

Nos epimastigotas tratados com GIB-24 e analisados por citometria de fluxo e microscopia eletrônica foi possível observar que esta diamina induziu:

- A) Dissipação do potencial de membrana mitocondrial, evidenciado pelo aumento na porcentagem de eventos Rhd- (Fig. 4.19), ocorrendo antes (6 horas de tratamento) do aparecimento de poros na membrana plasmática, os quais foram evidenciados por marcação PI+ somente a partir de 12 horas de tratamento, e somente com a maior concentração (Fig 4.18) .
- B) Arredondamento das células, com redução do tamanho celular, evidenciado tanto por microscopia eletrônica de varredura (Fig 4.23.), quanto por citometria de fluxo (Fig 4.17; Tab 4.14). Foi possível observar um aumento na porcentagem de células com tamanho reduzido em relação ao controle de 14 e 41 vezes, utilizando 6 μ M e 12 μ M de GIB-24, respectivamente.
- C) Vacuolização citoplasmática, evidenciados na microscopia eletrônica de transmissão (Fig 4.24).
- D) Marcação por Anexina V (Fig 4.22; Tab 4.15), vista principalmente (estatisticamente significativa) em células permeabilizadas, ou seja, com marcação dupla (anexinaV+ / PI+).

Se analisarmos o conjunto de alterações, temos indicio de que o processo de morte celular se assemelha ao de apoptose. Contudo, o marcador clássico de apoptose é a exposição de fosfatidilserina, evidenciada por ligação à anexina V, a qual também pode se ligar a outros fosfolípidos aniônicos (Jiménez-Ruiz et al., 2010). Há indícios de que a fosfatidilserina está ausente, ou abaixo do nível de detecção, em promastigotas de *Leishmania* spp., levantando dúvidas sobre a especificidade da anexina V em

protozoários parasitas. Além disso, anexina V pode ligar-se a outros fosfolípidos de *Leishmania* spp. que não estão ligados à apoptose, e muitos protozoários parasitas têm uma superfície densa contendo proteínas e glicocálix que podem impedir a anexina V de ter acesso à membrana plasmática. Assim, a ligação aumentada de anexina V pode não ser necessariamente indicativa de morte celular programada / apoptose (Proto et al., 2013).

Em protozoários tripanosomatídeos, embora vários grupos venham mostrando a existência de fenótipos característicos de morte celular programada – *apoptosis-like*, autofagia (Anjos et al., 2016; Jiménez-Ruiz et al., 2010; Sandes et al., 2014; Sen et al., 2004; Smirlis e Soteriadou, 2011) - a existência de morte celular regulada ainda é muito discutida. Embora marcadores e/ou correlatos moleculares de apoptose tenham sido observados em alguns protozoários parasitas analisados, as vias bioquímicas que precedem a sua aparição ainda não foram esclarecidas (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Proto et al., 2013; Smirlis e Soteriadou, 2011). Não há receptores de morte e vias de sinalização consistentes com necrose regulada ou outros tipos de morte celular programada (e eficientemente comprovados como fazendo parte destes processos) identificados nestes organismos (Proto, Coombs e Mottran, 2013). Por esses motivos Proto, Coombs e Mottran (2013) sugerem que as mortes celulares identificadas em protozoários parasitas, como os tripanosomatídeos, devam ser classificadas como mortes não reguladas, existindo dois tipos: necrose e morte incidental. Morte celular incidental é a que inclui os eventos de morte celular descritos na literatura os quais possuem algumas características morfológicas e bioquímicas características de processos de morte celular definidos (regulados) e, portanto, a morte celular identificada em *T. cruzi* tratados com GIB-24 deve ser classificada como morte celular incidental.

Ao avaliar o ciclo celular dos epimastigotas tratados com GIB-24 (Fig 4.21) observou-se uma parada no ciclo celular dos parasitas, ficando a maioria dos epimastigotas tratados (6 e 12 μ M) na fase G1, com conseqüente diminuição de parasitas nas fases S e G2-M. Este fenômeno não foi mais significativo após 24 horas de tratamento, ocorrendo uma diminuição significativa de epimastigotas na fase G2-M apenas com o tratamento de 12 μ M. Provavelmente os parasitas que apresentaram esta alteração morreram entre um período de análise e outro, visto que com 24 horas ocorre diminuição significativa no número de epimastigotas após o tratamento com GIB-24 (Fig 4.12). Tal diminuição significativa no número de epimastigotas tratados juntamente com

a observação que não há parada no ciclo celular sugerem que GIB-24 tem uma ação tripanocida.

O cinetoplasto é uma organela essencial, não só porque contém uma forma altamente especializada de DNA mitocondrial, mas também porque a sua duplicação e segregação estão estreitamente associadas ao progresso do ciclo celular, em particular a citocinese (Mbang-Benet et al., 2015). Em *T. brucei*, no estudo de 101 *RNAi knockdowns* com alvo em proteínas mitocondriais, a expressão cerca de 39 destas proteínas produziu uma redução de crescimento e parecia estar de alguma forma envolvida no progresso do ciclo celular (Mbang-Benet et al., 2015). Visto que o tratamento com GIB-24 induziu alterações no potencial de membrana mitocondrial (6 horas de tratamento) antes de ocorrer a permeabilização da membrana plasmática, é possível que a alteração no ciclo celular observada com 3 horas de tratamento esteja relacionada a alterações em proteínas mitocondriais.

A fim de verificar as possíveis vias alteradas pela ação de GIB-24 foi realizada a análise do proteoma de epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24, os quais foram eficientemente selecionados, mantendo-se viáveis mesmo tratados a essa concentração (2,5 x $CI_{50}/24h$), como observado por citometria de fluxo (Fig 4.27). A análise proteômica de epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24 resultou na identificação de 81 proteínas afetadas pelo tratamento com GIB-24 (Anexos 3, 4 e 5), as quais indicam que o composto age em proteínas envolvidas em processos biossintéticos metabólicos em geral, no transporte mitocondrial e na homeostase celular, incluindo homeostase redox celular. Os dados apontaram ainda o enriquecimento de proteínas que atuam como componentes de membrana plasmática, de organelas e mitocôndria. As funções moleculares desempenhadas estão envolvidas, principalmente, com o transporte de moléculas.

T. cruzi, junto com outros membros da família Trypanosomatidae, tem uma única mitocôndria que abriga o DNA mitocondrial. No entanto, além deste DNA, que corresponde ao encontrado em outras células eucarióticas, há uma grande quantidade de DNA organizado na forma de mini-círculos e concentrada num local específico abaixo do corpúsculo basal, que forma uma estrutura intra-mitocondrial conhecida como o cinetoplasto (Campos et al., 2009). No cinetoplasto encontram-se enzimas mitocondriais que participam tanto das funções metabólicas quanto respiratórias - como citocromo oxidase, succinato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, NADPH diaforase, alfa glicerol fosfato desidrogenase e beta hidroxibutirato desidrogenase – que proporcionam

aos parasitas adaptações alternativas para se adequarem a diferentes ambientes ao longo do seu ciclo de vida (Lukes et al. 2005; Motyka et al., 2006; Campos et al., 2009).

Dentre as proteínas encontradas como diferencialmente expressas encontramos a KAP6, proteína já caracterizada com localização mitocondrial e que atua junto ao rearranjo de kDNA (DNA dos minicirculos) que ocorre durante o processo de diferenciação de *T. cruzi* junto a outras KAPs (Cavalcanti et al., 2009). Outra importante proteína mitocondrial que teve expressão alterada nos epimastigotas resistentes a GIB-24 foi a chaperona de cobre da citocromo c oxidase, também chamada de Cox17, a qual facilita a incorporação de íons de cobre no sítio CuA do complexo citocromo c oxidase, (ou complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) ativando-o (Voronova et al., 2007; Zhao et al., 2015). O complexo citocromo c oxidase funciona como um complexo terminal de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e contém três íons de cobre funcionalmente importantes localizados no local CuA binuclear e no local CuB mononuclear (Voronova et al., 2007).

Asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, leucina, isoleucina e prolina são metabolizadas pelo *T. cruzi* e acredita-se que todos estes aminoácidos são oxidados através da sua conversão em glutamato ou aspartato, que pode ser transportado do citoplasma para as mitocôndrias e ser processado através do ciclo de Krebs. Glutamato e alanina estão diretamente envolvidos na alimentação do ciclo de Krebs como intermediários (Magdaleno et al., 2011). A aspartato aminotransferase putativa (Tc00.1047053503679.10) identificada entre as proteínas diferencialmente expressas na proteômica de epimastigotas resistentes a GIB-24 já foi caracterizada por Marciano e colaboradores (2008), sendo uma aspartato aminostransferase citosólica (cASAT) que exhibe atividade em relação aos aminoácidos aromáticos e dicarboxílicos. Também foi identificada uma glutamato desidrogenase putativa, que poderia ser responsável pela conversão de glutamato em α -cetoglutarato, o qual é processado pelo ciclo de Krebs para obtenção de energia (Magdaleno et al., 2011; Silber et al., 2005).

Ainda relacionadas ao metabolismo de aminoácidos foram encontradas uma leucil aminopeptidase citosólica putativa - relacionada à catálise da remoção de resíduos de aminoácidos N-terminais, preferencialmente leucina, de proteínas e peptídeos (Cadavid-Restrepo et al., 2011; Morty e Morehead, 2002) - e uma hipotética com domínio Aminotransferase de Classe IV (IPR001544). As D-Aminoácidos transferases (D-AAT), que estão entre os membros de aminotransferases de classe IV, são requeridas por

bactérias para catalisar a síntese de ácido D-glutâmico e D-alanina, constituintes essenciais da parede celular bacteriana (IPR001544).

Álcool desidrogenases (ADH) são uma classe de oxidoreduases que catalisam a oxidação reversível de etanol a acetaldeído, com redução de NAD. O gene de ADH de *T. cruzi* (TcADH) codifica uma ADH ativada com ferro do grupo III (El-Sayed et al., 2005). A sequência de aminoácidos da ADH putativa identificada na proteômica também já foi identificada por Campos e colaboradores (2009), com redução de expressão em populações com resistência induzida ao benzonidazol. É uma enzima com localização no cinetoplasto e que acredita-se, juntamente com outras enzimas mitocondriais, estar envolvida na redução e ativação de benzonidazol ou dos seus metabólitos nos parasitas suscetíveis ao fármaco, já que encontra-se em maior quantidade nestes parasitas (Campos et al., 2009). Portanto, a menor expressão de TcADH em parasitas resistentes pode estar envolvida com o mecanismo de resistência ao fármaco e, de maneira semelhante, a GIB-24.

Outras duas proteínas identificadas na proteômica de epimastigotas resistentes a GIB-24 foram as hipotéticas conservadas com domínio tioredoxina e outra com domínio heme peroxidase. As heme peroxidases são enzimas encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais, que exploram a redução do peróxido de hidrogênio para catalisar uma série de reações oxidativas, envolvendo uma ampla variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (Battistuzzi et al., 2010). As ascorbato peroxidases (APX) são enzimas contendo heme de classe I que convertem o peróxido de hidrogênio em moléculas de água (Nogueira et al., 2012). Em tripanosomatídeos a principal proteína com atividade relacionada a tioredoxina é a tripanoredoxina (Nogueira et al., 2009). O único sistema de defesa antioxidante em tripanosomatídeos é baseado no tiol T(SH)₂ (tripanotiona) de baixo peso molecular, que mantém o ambiente intracelular em estado reduzido essencialmente pela ação da tripanotiona redutase. Outras vias são acopladas com o ciclo de T(SH)₂ e catalisadas pela triparedoxina peroxidase e ascorbato peroxidase, sendo responsáveis pela detoxificação subsequente do peróxido de hidrogênio em água. Tanto tripanoredoxina peroxidase quanto ascorbato peroxidase encontram-se mais expressas em *T. cruzi* resistentes a benzonidazol (Nogueira et al., 2012). Ambas as enzimas hipotéticas encontradas em epimastigotas resistentes a GIB-24 também se encontram com expressão aumentada, sendo possível que estejam atuando na defesa antioxidante do parasita.

As sulfurtransferases são enzimas que catalisam a transferência de enxofre de sulfano de uma molécula doadora, tal como tiosulfato ou 3-mercaptopiruvato, para um

aceitador nucleofílico, tal como cianeto ou mercaptoetanol (Williams, et al., 2003). As rodanese sulfurtransferases, ou tiosulfato sulfurtransferases, domínio encontrado em uma proteína hipotética de epimastigotas resistentes a GIB-24, já foram implicadas na desintoxicação de cianeto, na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na desintoxicação de peróxido (Nakajima, 2015; Williams et al., 2003). Já se mostrou que as sulfurtransferases de *Leishmania* tem uma forte atividade em relação ao 3-mercaptopiruvato e tioredoxina, desempenhando algum papel ainda não totalmente elucidado no metabolismo de aminoácidos antioxidante e enxofre (Williams et al., 2003).

Preconiza-se que o mecanismo de ação de diaminas deve agir no metabolismo de poliaminas de tripanosomatídeos, afetando a ação destas moléculas e suas enzimas associadas (Sales Júnior et al., 2010; Velásquez et al., 2014; Yamanaka et al., 2013). Uma das vias que poderiam ser afetadas é a da síntese de tripanotiona, uma molécula central para o equilíbrio redox em tripanosomatídeos (Flohé, 2012; Müller et al., 2001). As diaminas podem interferir com enzimas como ornitina descarboxilase (ODC) e AdoMetDC, que são essenciais na biossíntese de poliaminas. A tripanotiona redutase (TR) e a tripanotiona sintase (TS) são duas enzimas-chave envolvidas na via das poliaminas e são alvos validados para o desenvolvimento de novos fármacos contra os parasitas cinetoplastídeos (Yamanaka et al., 2013).

A análise inicial das diferenças de expressão de proteínas entre epimastigotas de *T. cruzi* resistentes a 15 μ M de GIB-24 e de epimastigotas não tratados começa a elucidar as vias pela qual o composto age, indicando que funções mitocondriais, o metabolismo de aminoácidos e o controle do estresse oxidativo são alvos deste composto. Entretanto, ainda não podemos afirmar que o composto age especificamente nas vias envolvendo a tripanotiona, como preconizado para diaminas em geral. A continuidade do estudo das proteínas diferencialmente expressas pela ação do composto é uma perspectiva que deve melhorar a compreensão de como GIB-24 age e de como as vias atingidas pelo composto podem estar se comunicando. De maneira mais ampla, pode dar suporte ao entendimento do mecanismo de ação de diaminas sobre *T. cruzi*.

6. CONCLUSÕES

- Triagem de 81 compostos após 24 horas de tratamento em formas epimastigotas de *T. cruzi* demonstrou que a maioria (60) não teve atividade e vários tiveram atividade pouco seletiva sobre a viabilidade de *T. cruzi*, sendo muito citotóxicos em células Vero. Dentre os compostos com este perfil encontram-se: bases de Mannich derivadas de pirazinamida; derivados pirazolínicos obtidos a partir de chalconas; derivados antraquinônicos (cadeias laterais: éteres/organohalogenados, amino-alcoois ou diaminas) com estrutura análoga a mitoxantrona; 1,3,4-oxadiazóis obtidos a partir de reações de N-acilidrazonas em reação com anidrido acético; complexos de rutênio mercaptotiazolínicos; os constituintes de óleo essencial cinamaldeído e nerolidol;
- Dentre as quatro azlactonas avaliadas, o composto EPA-35 foi o mais seletivo em epimastigotas (IS = 6,74) e amastigotas intracelulares (IS = 95,04). Entretanto foi menos seletivo que benzonidazol (IS = 223,68 epimastigotas; IS = 396,50 amastigotas);
- Análise por citometria de fluxo mostrou que a azlactona EPA-35 induz a dissipação do potencial e membrana mitocondrial e reduz o tamanho celular do epimastigotas tratados;
- EPA-35 tem atividade tripanocida e leva a uma morte celular incidental
- Dentre as 17 diaminas avaliadas, 3 demonstraram atividade seletiva contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*: GSC-01 (IS= 10,04), CGE (IS = 10,97) , GIB-24 (IS = 7,18);
- GIB-24 tem atividade tripanocida com redução de epimastigotas sem alteração no ciclo celular de epimastigotas tratados por 24 horas (CI₅₀ = 6 µM epimastigotas)
- Análise por citometria de fluxo mostrou que a diamina GIB-24 induziu a dissipação do potencial e membrana mitocondrial antes de induzir a permeabilidade da membrana plasmática, reduziu o tamanho celular do epimastigotas tratados, levou à exposição de fosfatidilserina. Os dados sugerem que GIB-24 induz morte celular incidental em parasitas tratados com GIB-24.
- GIB-24 promove amastigogênese *in vitro* e reduz a quantidade de parasitas no sobrenadante de infecções tratadas

- Análise inicial da proteômica de epimastigotas resistentes a 15 μ M de GIB-24 indica que GIB-24 age preferencialmente em proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas, em funções mitocondriais e no controle de estresse oxidativo. Entretanto é necessário aprofundar estas análises para melhor visualização do mecanismo de ação e como as proteínas diferencialmente expressas se comunicam;
- Embora nossos resultados não apoiem o uso clínico na forma atual de EPA-35, GIB-24, GSC-01 e CGE, estes são compostos promissores para avaliações adicionais contra o *T. cruzi*. Estudos adicionais sobre a transformação sintética destes compostos em outros derivados podem produzir um composto com citotoxicidade reduzida e atividade aumentada contra *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-ATY, A. S. Pesticidal effects of some imidazolidine and oxazolone derivatives **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, p. 105-113, 2009.

ALVIANO, D.S.; BARRETO, A.L.S.; DIAS, F.A.; RODRIGUES, I.A.; ROSA, M.S.S.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M.A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 283, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00283.

ANJOS, D.O.; ALVES, E.S.S.; GONÇALVES, V.T.; FONTES, S.S.; NOGUEIRA, M. L.; SUAREZ-FONTES, A.M.; COSTA, J.B.N.; RIOS-SANTOS, F.; VANNIER-SANTOS, M.A. Effects of a novel belapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, p. 207-219, 2016.

ÁVILA, E.P.; AMARANTE, G.W. Recent advances in Asymmetric Counteranion-Directed Catalysis (ACDC). **ChemCatChem**, v. 4, p. 1713-1721, 2012. doi:10.1002/cctc.201200422.

ÁVILA, E.P.; DE MELLO, A.C.; DINIZ, R.; AMARANTE, G.W. Brønsted acid catalyzed highly diastereoselective Michael-type of azlactones to enones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1881-1883, 2013. doi: 10.1002/ejoc.201300076

ÁVILA, E.P.; JUSTO, R.M.S.; GONÇALVES, V.P.; PEREIRA, A.A.; DINIZ, R.; AMARANTE, G.W. Chiral Brønsted acid-catalyzed stereoselective Mannich-type reaction of azlactones with aldimines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, p. 590-594, 2015. doi:10.1021/jo5024975

AZEREDO, C.M.O.; SOARES, M.J. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n.5, p. 762-768, 2013.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BALA, S.; SAINI, M.; KAMBOJ, S. Methods for synthesis of oxazolones, a review. **International Journal of ChemTech Research CODEN**, v. 3, p. 1102-1118, 2011.

BALA S., SAINI M., KAMBOJ S., SAINI V. Synthesis of 2-[4-(substituted benzylidene)-5-Oxo-4,5-dihydro-oxazol-2-ylmethyl]-isoindole-1,3-dione Derivatives as Novel Potential Antimicrobial Agents. **Iranian Journal of Pharmaceuticals and Therapeutics**, v. 11, p. 45-52, 2012.

BALANÑA-FOUCE, R; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; GARCÍA-ESTRADA, C.; REGUERA, R. M. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 326–337.

BARBOSA, L.C.A.; TEIXEIRA, R.R.; AMARANTE, G.W. Synthetic strategies for the preparation of butenolides and their transformation into other derivatives. **Current Organic Synthesis**, v. 12, p. 746-771, 2015.

BASILE, L.; JANSÀ, J.M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D.D.; ANGHEBEN, A.; BARTOLONI, A.; SEIXAS, J.; VAN GOOL, T.; CAÑAVATE, C.; FLORES-CHÁVEZ, M.; JACKSON, Y.; CHIODINI, P.L.; ALBAJAR-VIÑAS, P. Working Group on Chagas Disease. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **EuroSurveillance**, v. 16, n. 37, p. 19968. 2011.

BATTISTUZZI G.; BELLEI, M.; BORTOLOTTI, C.A.; SOLA, M. Redox properties of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 21–36, 2010.

BENÍTEZ, D.; MEDEIROS, A.; FIESTAS, L.; PANOZZO-ZENERE, E.A.; MAIWALD, F.; PROUSIS, K.C.; ROUSSAKI, M.; CALOGEROPOULOU, T.; DETSI, A.; JAEGER, T.; ŠARLAUSKAS, J.; MAŠIČ, L. P.; KUNICK, C.; LABADIE, G.R.; FLOHÉ, L.; COMINI, M.A. Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting

Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10: e0004617, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004617

BENÍTEZ, J.; GUGGERI, L.; TOMAZ, I.; PESSOA, J.C.; MORENO, V.; LORENZO, J.; AVILÉS, F.X.; GARAT, B.; GAMBINO, D. A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.103, p.1386–1394, 2009.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J.P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BLUMENTAL, S.; LAMBERMONT, M.; HEIJMANS, C.; RODENBACH, M.P.; EL KENZ, H.; SONDAG, D.; BOTTIEAU, E.; TRUYENS, C. First Documented Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection through Blood Transfusion in a Child with Sickle-Cell Disease in Belgium. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 10, p. e0003986, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003986

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BURCHMORE, R.J.; BARRETT, M.P. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1311-20, 2001.

CADAVID-RESTREPO, G.; GASTARDELO, T.S.; FAUDRY, E.; ALMEIDA, H.; BASTOS, I.M.D.; NEGREIROS, R.S.; LIMA, M.M.; ASSUMPCÃO, T.C.; ALMEIDA, K.C.; RAGNO, M.; EBEL, C.; RIBEIRO, B.M.; FELIX, C.R.; SANTANA, J.M. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. **BMC Biochemistry**, v. 12, p. 46, 2011. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/46>

CALIXTO JÚNIOR, J.T.; MORAIS, S.M.; GOMEZ, C.V.; MOLAS, C.C.; ROLON, M.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; OLIVEIRA, C.D.M; TINTINO, S.R.; COUTINHO, H.D.M. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 434–440, 2016.

CAMPOS, F.M.F.; LIARTE, D.B.; MORTARA, R.A.; ROMANHA, A.J.; MURTA, S.M.F. Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benzimidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 56–63, 2009.

CAMPOS, M.C.O; SALOMÃO, K.; CASTRO-PINTO, D.B.; LEON, L.L.; BARBOSA, H.S.; MACIEL, M.A.M.; CASTRO, S.L. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v.107, p.1193–1204, 2010

CARRILLO, C.; CEJAS, S.; GONZALEZ, N.S.; ALGRANATI, I.D. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. **FEBS Letters**, v.; 454, p.192–196, 1999

CARRILLO, C.; CEJAS, S.; HUBER, A.; GONZALEZ, N.S.; ALGRANATI, I.D. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 312–316, 2003.

CAVALCANTI, D.P.; SHIMADA, M.K.; PROBST, C.M.; SOUTO-PADRÓN, T.C.B.S.; SOUZA, W.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P.; MOTTA, M.C.M. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 9, p.120, 2009. doi:10.1186/1471-2180-9-120

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **J Biomol Screen**, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1177/1087057114550585

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S.B.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2023–2029, 2001. Doi: 10.1128/AAC.45.7.2023–2029.2001

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 115, p. 207-216, 1981.

COLOTTI G, ILARI A. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, p. 269–285, 2011.

CONTRERAS, V.T.; SALLES ,J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol Biochem Parasitol. v. 13, p 315-327, 1985.

COURA J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p. 113-122, 2007.

COURA, JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p.549-554, 2009.

CORRÊA, R.S.; SILVA, M.M.; GRAMINHA, A.E.; MEIRA, C.S.; SANTOS, J.A.F.; MOREIRA, D.R.M.; SOARES, M.B.P.; POELHSITZ, G.V.; CASTELLANO, E.E.; BLOCH JR, C.; COMINETTI, M.R.; BATISTA, A.A. Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: Cytotoxicity against tumor cells and anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhanced upon combination with benznidazole. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 156, p. 153–163, 2016.

DEBRABANT, A.; LEE, N.; BERTHOLET, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular Organisms. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 257–267, 2003.

DESAI, N.C.; BHAVSAR, A.M.; BALDANIYA, B.B. Synthesis and Antimicrobial Activity of 5-Imidazolinone. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 90-94, 2009. doi: 10.4103/0250-474X.51953.

DETERDING, A.; DUNGEY, F.A.; THOMPSON, K.A.; STEVERDING, D. Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. **Acta Tropica**, v. 93, p. 311–316, 2005.

DI PAOLA, D.; RAMPAKAKIS, E.; CHAN, M.K.; ARVANITIS, D.N.; ZANNIS-HADJOPOULOS, M. Increased origin activity in transformed versus normal cells: identification of novel protein players involved in DNA replication and cellular transformation. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 2314–2331, 2010.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DINIZ L.F., URBINA J.A., DE ANDRADE I.M., MAZZETI A.L., MARTINS T.A.F., CALDAS I.S., TALVANI A., RIBEIRO I., BAHIA M.T. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, p. e2367, 2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002367

DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; JAQUINOD, M.; CADET, J. *In vitro* DNA synthesis opposite oxazolone and repair of this DNA damage using modified oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 1555-1563, 2000.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E.A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D.C.; HAAS, B.J.; TRAN, A.N.; WORTMAN, J.R.; ALSMARK, U.C.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J.M.; CERQUEIRA, G.C.; CREASY, T.; DELCHER, A.L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T.M.; HAUSER, C.; IVENS, A.C.; KUMMERFELD, S.K.; PEREIRA-LEAL, J.B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.;

SALZBERG, S.L.; SHALLOM, J.; SILVA, J.C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S.E.; DONELSON, J.E.; ANDERSSON, B.; STUART, K. D.; HALL, N. Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, p. 404–409. 2005.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184-190, 2010.

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

FLOHÉ, L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, p. 216– 220, 2012.

FREITAS, E.C. Inquérito Soroepidemiológico Da Doença De Chagas No Município De Limoeiro Do Norte, Ceará Em 2013. 95f. 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal do Ceará.

FRICKER, S.P.; MOSI, R.M.; CAMERON, B.R.; BAIRD, I.; ZHU, Y.; ANASTASSOV, V.; COX, J.; DOYLE, P. S.; HANSELL, E.; LAU, G.; LANGILLE, J.; OLSEN, M.; QIN, L.; SKERLJ, R.; WONG, R.S.Y; SANTUCCI, Z.; MCKERROW, J. H. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.102, p.1839–1845, 2008.

GARCIA, F.P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S.O.; NAKAMURA, C.V. Eupomatenoid-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 94053, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/940531>

GOTTWALD, K.; SEEBACH, D. Ring opening with kinetic resolution of azlactones by Ti-TADDOLates. **Tetrahedron**, v. 55, p. 723-738, 1998.

HAN, X.; CUI, C.; GU, Q.; ZHU, W.; LIU, H.; GU, J.; OSADA, H. ZHD-0501, a novel naturally occurring staurosporine analog from *Actinomadura* sp. 007. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 6197-6140, 2005.

HERNANDEZ-OSORIO, L.A.; MARQUEZ-DUE, C.; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R. G. Improved Method for *In Vitro* Secondary Amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: Morphometrical and Molecular Analysis of Intermediate Developmental Forms. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 283842, 2010. doi:10.1155/2010/283842

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Products Reports**, v. 28, n. 4, p. 809-823, 2011.

IPR001544. Disponível em < <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001544>>

JAT, R.L.; MISHRA, R.; PATHAK, D. Synthesis and anticancer activity of 4-benzylidene-2-phenyloxazol-5-(4h)-one derivatives. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p.378-380, 2012.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J.F.; MACLEOD, E.T.; LÜDER, C.G.K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 104, 2010

LEGARDA-CEBALLOS, A.L.; DEL OLMO, E.; LÓPEZ-ABÁN, J.; ESCARCENA, R.; BUSTOS, L.A.; FONSECA-BERZAL, C.; GÓMEZ-BARRIO, A.; DIB, J.C.; FELICIANO, A. S.; MURO, A. Trypanocidal Activity of Long Chain Diamines and Aminoalcohols. **Molecules**, v. 20, p. 11554-11568, 2015. doi:10.3390/molecules200611554

LNBio, Laboratory of Mass Spectrometry, CNPEM. **Tutorial for proteome data analysis using the Perseus software platform** Tutorial version 1.0, January 2014.

LÜDER, C.G.K.; CAMPOS-SALINAS, J.; GONZALEZ-REY, E.; ZANDBERGEN, G. V. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & Vectors**, 3:116, 2010.

LUKES, J.; HASHIMI, H.; ZIKOVA, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. **Current Genetics**, v. 48, p. 277–299, 2005.

LUTY, M.; KWIECIEŃ, E.; FIRLEJ, M.; ŁABĘDŹ-MASŁOWSKA, A.; PAW, M.; MADEJA, Z.; CZYŻ, J. Curcumin augments the cytostatic and anti-invasive effects of mitoxantrone on carcinosarcoma cells *in vitro*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 3, p.397-401, 2016. Doi: http://dx.doi.org/10.18388/abp.2016_1314

MAGDALENO, A.; MANTILLA, B.S.; ROCHA, S.C.; PRAL, E.M.F.; SILBER, A.M. The Involvement of Glutamate Metabolism in the Resistance to Thermal, Nutritional, and Oxidative Stress in *Trypanosoma cruzi*. **Enzyme Research** 2011, Article ID 486928, 2011. doi:10.4061/2011/486928

MARCIANO, D.; LLORENTEA, C.; MAUGERI, D.A.; DE LA FUENTE, C.; OPPERDOES, F.; CAZZULO, J.J.; NOWICKI, C. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 161, p.12–20, 2008.

MARTINS, T. A. F.; DINIZ, L. F.; MAZZETI, A. L.; NASCIMENTO, A. F. S.; CALDAS, S.; CALDAS, I. S.; ANDRADE, I. M.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole/Itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. **PLoS ONE**, v. 10, p. e0128707, 2015. DOI: <http://doi:10.1371/journal.pone.0128707>

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of

natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 146, p. 601–620, 2007.

MBANG-BENET, D.E.; STERKERS, Y.; CROBU, L.; SARRAZIN, A.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M. RNA interference screen reveals a high proportion of mitochondrial proteins essential for correct cell cycle progress in *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 297, 2015.

MEDEIROS, M. G. F.; SILVA, A. C.; CITÓ, A. M. G. L.; BORGES, A. R.; LIMA, S. G.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. Q. B. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, p. 237-241, 2011.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic Trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, Article 614014, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/614014>

MESIA, G.K.; TONA, G. L.; NANGA, T. H.; CIMANGA, R. K.; APERS. S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 409–415, 2008.

MONTESINO, N.L.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, T. J. Search for Antiprotozoal Activity in Herbal Medicinal Preparations; New Natural Leads against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 20, p. 14118-14138; 2015. doi:10.3390/molecules200814118

MORTY, R. E.; MOREHEAD, J. Cloning and Characterization of a Leucyl Aminopeptidase from Three Pathogenic *Leishmania* Species. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26057–26065, 2002.

MOSHIRI, H.; MEHTA, V.; YIP, C. W.; SALAVATI, R. Pilot-Scale Compound Screening against RNA Editing Identifies Trypanocidal Agents. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 92–100, 2015. DOI: 10.1177/1087057114548833

MOTYKA, S.A.; DREW, M.E.; YILDIRIR, G.; ENGLUND, P.T. Overexpression of a cytochrome b5 reductase-like protein causes kinetoplast DNA loss in *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 18499–18506, 2006.

MUKERJEE, A. K. Azlactones: retrospect and prospect. **Heterocycles**, v. 26, p. 1077-1097, 1987.

MÜLLER, S.; COOMBS, G. H.; WALTER, R. D. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 5, p. 242–249, 2001. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01908-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01908-0)

MURTA, S. M F.; GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 203–214, 1998.

NAKAJIMA, T. Roles of Sulfur Metabolism and Rhodanese in Detoxification and Anti-Oxidative Stress Functions in the Liver: Responses to Radiation Exposure. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 1721-1725, 2015. Doi: 10.12659/MSM.893234

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23-24, p. 1070-1078, 2010.

NOGUEIRA, F. B.; RODRIGUES, J. F. A.; CORREA, M. M. S.; RUIZ, J. C.; ROMANHA, A. J. R.; MURTA, J. M. F. The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of *Trypanosoma cruzi* and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 494-502, 2012.

NOGUEIRA, F. B.; RUIZ, J. C.; ROBELLO, C.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. F. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitology Research**, v. 104, p. 835–844, 2009.

NUSSBAUM, K.; HONEK, J.; CADMUS, C.M.C.C.; EFFERTH, T. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p. 1594-1617, 2010.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JÚNIOR, A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. **Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas No Brasil**. Revista De Patologia Tropical, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008a.

OLIVEIRA, V.C.S.; MOURA, D.M.S.; LOPES, J.A.D.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053-1059, 2008b.

O’SULLIVAN, M. C.; DURHAM, T. B.; VALDES, H. E.; DAUER, K. L.; KARNEY, N. J.; FORRESTEL, A. C.; BACCHI, C. J.; BAKER, J. F. Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; molecular docking, and assessment of trypanocidal activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 996–1010, 2015.

PASSALACQUA, T. G.; DUTRA, L. A.; ALMEIDA, L.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; TORRES, F. A. E.; YAMASAKI, P. R.; SANTOS, M. B.; REGASINI, L. O.; MICHELS, P. A. M.; BOLZANI, V. S.; GRAMINHA, M. A. S. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 3342–3345, 2015.

PEREIRA, A. A.; DE CASTRO, P.P.; DE MELLO, A. C.; FERREIRA, B. R. V.; EBERLIN, M. N.; AMARANTE, G. W. Brønsted acid catalyzed azlactone ring opening by nucleophiles. **Tetrahedron**, v. 70, p. 3271-3275, 2015.

PINHEIRO, D. L. J.; BATISTA, G. M. F.; GONÇALVES, J. R.; DUARTE, T. N.; AMARANTE, G. W. Sugar-based organocatalyst for the diastereoselective desymmetrization of dibenzylideneacetones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 3, p. 459-462, 2016.

PLANER, J. D.; HULVERSON, M. A.; ARIF, J. A.; RANADE, R. M.; DON, R.; BUCKNER, F. S. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, p. e2977, 2014. <http://doi:10.1371/journal.pntd.0002977>

PITTELA, J.E.H. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, p. 973-978, 2009.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 58 – 66, 2013.

PUCCI, MM. Análise proteômica da forma amastigota de populações de *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol. Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. 119p. 2009.

QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S.; MANDACARU, S. C.; SCHWAMMLE, V.; LIMA, B. D.; ROEPSTORFF, P.; RICART, C. A. O. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Amastigogenesis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, p. 3457-3472, 2014.

RAJÃO, M. A.; FURTADO, C.; ALVES, C. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; MOURA, M. B.; SCHAMBER-REIS, B. L.; KUNRATH-LIMA, M.; ZUMA, A. A.; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; GARCIA, J. B. F.; MENDES, C. I.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; SOUZA-PINTO, N. C.; MEDEIROS, M. H. G.; CRUZ, A. K.; MOTTA, M. C. M.; TEIXEIRA, S. M. R.; MACHADO, C. R. Unveiling Benznidazole's

Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, p.309-321, 2014.

REIGADA, C.; SAYE, M; VERA, E. V.; BALCAZAR, D.; FRACCAROLI, L.; CARRILLO, C.; MIRANDA, M.R.; PEREIRA, C. A. *Trypanosoma cruzi* Polyamine Transporter: Its Role on Parasite Growth and Survival Under Stress Conditions. **The Journal of Membrane Biology**, doi:10.1007/s00232-016-9888-z

REQUENA-MÉNDEZ, A.; ALDASORO, E.; DE LAZZARI, E.; SICURI, E.; BROWN, M.; MOORE, D. A.; GASCON, J.; MUÑOZ, J. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 2, p. e0003540, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003540

ROMANHA A.J.;CASTRO S.L.; SOEIRO, M.N.C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L.I.; BAHIA, M.T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z.A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010

ROUSSAKI, M.; HALL, B.; LIMA, S. C.; DA SILVA, A. C.; WILKINSON, S.; DETSI, A. Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone–chalcone series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 6436–6441, 2013.

RYCZAK, J.; PAPINI, M.; LADER, A.; NASEREDDIN, A.; KOPELYANSKIY, D.; PREU, L.; JAFFE, C. L.; KUNICK, C. 2-Arylpauillones are selective antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 396e400, 2013.

SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 23-30, 2004.

SANDES, J. M.; FONTES, A.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; CASTRO M. C. A. B.; LIMA-JUNIOR, C. G.; SILVA, F. P. L.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. *Trypanosoma cruzi* Cell Death Induced by the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile). **PLoS ONE** v. 9, n. 4, p. e93936, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0093936

SALES JÚNIOR, P.A.; REZENDE JÚNIOR, C. O.; LE HYARIC, M.; ALMEIDA, M. V.; ROMANHA, A. J. The *in vitro* activity of fatty diamines and amino alcohols against mixed amastigote and trypomastigote *Trypanosoma cruzi* forms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 362-364, 2014.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of the essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007a

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; SOARES, M.J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, p. 783-790, 2007b

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v.134, p. 1649–1656, 2007c.

SANTOS, D.; PARAJÓN-COSTA, B.; ROSSI, M.; CARUSO, F.; BENÍTEZ, D.; VARELA, J.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; GÓMEZ, N.; CAPUTTO, M. E.; MOGLIONI, A. G.; MOLTRASIO, G. Y.; FINKIELSZTEIN, L. M.; GAMBINO, D. Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 1-indanones. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 270–276, 2012.

SAVERIA, T.; KESSLER, P.; JENSEN, B. C.; PARSONS, M. Characterization of glycosomal RING finger proteins of trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 14–24, 2007.

SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C. ; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases – Part I. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 2128-2175, 2012.

SEN, N.; DAS, B. B.; GANGULY, A.; MUKHERJEE, T.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52366-52375, 2004.

SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z.A.; SILVA, M.C.; SANTOS, M.; SILVA, G.K.; MILANEZI, C.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J.S. Ruthenium Complex with Benznidazole and Nitric Oxide as a New Candidate for the Treatment of Chagas Disease. **PLoS Negl Tropical Disease**, v. 8, n. 10, p. e3207, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003207

SHARMA, N.; BANERJEE, J.; SHRESTHA, N.; CHAUDHURY, D. A review on oxazolone, it's method of synthesis and biological activity. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 964-987, 2015.

SIDDIQUI, S. A.; BHUSARE, S. R.; JARIKOTE, D. V.; PAWAR, R. P.; VIBHUTE, Y. B. New Novel Synthesis and Antibacterial Activity of 1-(Substituted phenyl)-2- phenyl-4-(3'-halo, 4'-hydroxy 5'-methoxy benzylidene)-imidazole-5-ones. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 22, p. 1033-1036, 2001.

SILBER, A. M.; COLLI, W.; ULRICH, H.; ALVES, M. J. M.; PEREIRA, C. A. Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas' Disease. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v., 5, p. 53-64, 2005.

SMIRLIS, D.; SOTERIADOU, K. Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. **Virulence**, v. 2, n. 3, p. 253-256, 2011. DOI: 10.4161/viru.2.3.16278

SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, n. 1, p. 3, 2002.

SOUZA, L. M. Caracterização Morfoestrutural E Molecular Do Processo De Amastigogênese Extracelular Em *Trypanosoma cruzi*. 117f. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná.

TANDON, M.; COFFEN, D. L.; GALLANT, P.; KEITH, D.; ASHWELL, M.A. Potent and selective inhibitors of bacterial methionyl tRNA synthetase derived from an oxazolone-dipeptide scaffold. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p. 1909-1911, 2004.

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas Disease - **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006

THERMOFISHER SCIENTIFIC. Propidium Iodide Product Description, 2017. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP>>. Acessado em: 25/03/2017.

URBINA JA. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p.149-156, 2015.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2010.

VELÁSQUEZ, A. M. A.; FRANCISCO, A. I.; KOHATSU, A. K. N.; JESUS SILVA, F. A.; RODRIGUES, D. F.; TEIXEIRA, R. G. S.; CHIARI, B. G.; ALMEIDA, M. G. J.; ISAAC, V. L. B.; VARGAS, M. D.; CICARELLI, R. M. B. Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1707–1710, 2014.

VIEITES, M.; SMIRCICH, P.; PARAJÓN-COSTA, B.; RODRÍGUEZ, J.; GALAZ, V.; OLEA-AZAR, C.; OTERO, L.; AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; GÓMEZ-BARRIO, A.; GARAT, B.; GAMBINO, D. Potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. **Journal of biological inorganic chemistry : JBIC**, v. 13, n. 5, p. 723-735, 2008. doi: 10.1007/s00775-008-0358-7.

VIEITES, M.; SMIRCICH, P.; PAGANO, M.; OTERO, L.; FISCHER, F. L.; TERENCE, H.; PRIETO, M. J.; MORENO, V.; GARAT, B.; GAMBINO, D. DNA as molecular target of analogous palladium and platinum anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: A comparative study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 1704–1711, 2011.

VILLAMIZAR, L. H. S. Estudo do efeito inibitório dos óleos essenciais de pimenta de Macaco (*Piper aduncum*) e pimenta longa (*Piper hispidinervum*) contra *Trypanosoma cruzi*. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Insituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR, Curitiba, 2015.

VORONOVA, A.; KAZANTSEVA, J.; TUULING, M.; SOKOLOVA, N.; SILLARD, R.; PALUMAA, P. Cox17, a copper chaperone for cytochrome *c* oxidase: Expression, purification, and formation of mixed disulphide adducts with thiol reagents. **Protein Expression and Purification**, v. 53, p. 138–144, 2007.

WHO (World Health Organisation). Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact Sheet, March 2016. Disponível em:

< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> > Acesso em: 30/03/2016

WILLIAMS, R. A. M.; KELLY, S. M.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase of *Leishmania* Contains an Unusual C-terminal Extension and Is Involved in Thioredoxin and Antioxidant Metabolism. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1480–1486, 2003.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012. doi:10.3390/molecules171112771

WISNIEWSKI, J.; ZOUGMAN, A.; MANN, M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. **Journal of proteome research**, n. 8, p. 5674–5678, 2009.

YAMANAKA, C. N.; GIORDANI, R. B.; REZENDE JR, C. O.; EGER, I.; KESSLER, R. L.; TONINI, M. L.; MORAES, M. H.; ARAÚJO, D. P.; ZUANAZZI, J. A.; ALMEIDA, M. V.; STEINDEL, M. Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 82, n. 6, p. 697-704, 2013. doi: 10.1111/cbdd.12191

ZHAO, L.; WANG, Z.; WU, H.; XI, Z.; LIU, Y. Glutathione selectively modulates the binding of platinum drugs to human copper chaperone Cox17. **Biochemical Journal**, v. 472, p. 217–223, 2015. doi:10.1042/BJ20150634

ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; MAIA, M. C. P.; SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 449–456, 2011.

ANEXO 1: ARTIGO CINAMALDEÍDO

Azeredo et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, **14**:309
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/309>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil

Camila Maria O Azeredo¹, Thalita Gilda Santos², Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia² and Maurilio José Soares^{1*}

Abstract

Background: Essential oils (EOs) are complex mixtures of secondary metabolites from various plants. It has been shown that several EOs, or their constituents, have inhibitory activity against trypanosomatid protozoa. Thus, we analyzed the biological activity of different EOs on *Trypanosoma cruzi*, as well as their cytotoxicity on Vero cells.

Methods: The following EOs were evaluated on *T. cruzi* epimastigote forms: *Cinnamomum verum*, *Citrus limon*, *Cymbopogon nardus*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora*, *Myrocarpus frondosus*, and *Rosmarinus officinalis*. Inhibitory activity against *T. cruzi* (IC₅₀/24 h) and cytotoxicity against Vero cells (CC₅₀/24 h) were evaluated by the MTT assay. The EO of *C. verum* was selected for further evaluation against trypomastigotes and intracellular amastigotes, as well as on parasite metacyclogenesis. Constituents of *C. verum* EO were identified by GC-MS. One-way ANOVA statistical analysis was performed with GraphPad version 5.01.

Results: *Cinnamomum verum* EO was the most effective against *T. cruzi* epimastigotes (IC₅₀/24 h = 24.13 µg/ml), followed by *Myrocarpus frondosus* (IC₅₀/24 h = 60.87 µg/ml) and *Eugenia uniflora* (IC₅₀/24 h = 70 µg/ml). The EOs of *C. citriodora*, *E. globulus*, and *R. officinalis* showed no activity at concentrations up to 300 µg/ml. Incubation of *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes and intracellular amastigotes with *C. verum* EO resulted in IC₅₀/24 h values of 5.05 µg/ml and 20 µg/ml, respectively. Therefore, trypomastigotes are more susceptible than epimastigotes, with selectivity index (SI) about 4.7-fold higher (9.78 and 2.05, respectively). Analysis of *C. verum* EO by GC-MS showed mainly (*E*)-cinnamaldehyde (81.52%) and eugenol (16.68%).

Conclusions: *C. verum* essential oil is effective against *T. cruzi* (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes) and interferes with the parasite differentiation process in vitro. Thus, it represents a strong candidate for further studies to improve its activity on pathogenic trypanosomatids.

Keywords: Cinnamon, *Cinnamomum verum*, Essential oil, *Trypanosoma cruzi*

Background

Chagas disease, caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a chronic disease that occurs mainly in Latin America. It is estimated that 7–8 million people are infected worldwide [1]. Most infected people live in endemic areas, comprising 21 Latin America countries [1]. Chagas disease is technically considered a zoonosis, as the natural reservoirs are marsupials and placental

mammals. The disease in humans results from the invasion of natural ecotopes and the establishment of vectors in human dwellings in endemic areas because of poor socio-economic conditions in most rural populations [2].

T. cruzi is naturally transmitted by blood-sucking insects of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Human infection occurs usually by insect bite, oral transmission, blood transfusion, or congenital transmission [2-4]. Transmission through blood transfusion, congenitally, and with intense international migration, has led to spread of

* Correspondence: maurilio@tecpar.br

¹Laboratory of Cell Biology, Carlos Chagas Institute/Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Azeredo et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

the disease to non-endemic regions, such as United States and Western Europe [2].

Two drugs emerged in the late 1960s for the treatment of Chagas disease: benznidazole (Rochagan in Brazil and Radanil in Argentina, from Roche) and nifurtimox (Lampit, from Bayer). These two drugs are still the only ones available for Chagas disease. Both drugs were originally recorded for treatment of the acute phase of Chagas disease, but are currently used in both acute and initial chronic phases [2,5]. However, these chemotherapeutic drugs do not completely fill the World Health Organization (WHO) criteria for an ideal drug, which are: (i) parasitological cure in acute and chronic cases of infection, (ii) effectiveness in a single dose or a few doses, (iii) accessibility to patients (low cost and easy to achieve), (iv) no teratogenic or side effects, (v) no need for hospitalization of patients for treatment, and (vi) without showing resistance or induction of resistance to the etiological agent [6]. Furthermore, efficacy in the acute phase varies with the geographical area, probably because of differences in susceptibility between different strains of *T. cruzi* [2].

Maintenance of new cases in endemic regions and the recent spread of the disease into non-endemic regions point towards the need to find drugs that are effective both in treatment of disease and prophylaxis of *T. cruzi* in blood banks. Various drugs for the treatment of parasitic diseases have been extracted from plants or synthesized from vegetal prototypes [7,8]. Therefore, the study of extracts and compounds with biological activity isolated from plants used in folk medicine is promising in the search for compounds with potential for the prophylaxis of Chagas disease.

Essential oils (EOs) are complex mixtures of secondary metabolites isolated from various plants, which may be synthesized by all plant organs. In these mixtures there are 20–60 constituents at different concentrations, but usually only 2–3 major constituents determine the biological properties of the EO [9]. Essential oils and their constituents present a broad pharmacological spectrum, and are used as antimicrobials, analgesics, sedatives, anti-inflammatory, and anti-spasmodic drugs, as well as anthelmintics and antiprotozoals [6,9-13].

It has been recently shown that several EOs, or their constituents, have inhibitory activity against trypanosomatid protozoa [6,14-22]. However, most studies in *T. cruzi* evaluated the inhibitory activity only on culture epimastigotes and blood trypomastigotes. The data are sparse on the effect of EOs, or their main constituents, on cell differentiation (metacyclogenesis) and on *T. cruzi* intracellular amastigotes. Thus, we have analyzed the effect of different EOs, with emphasis on *Cinnamomum verum* EO, on epimastigotes, trypomastigotes, and amastigotes, as well as on the process of differentiation in vitro (metacyclogenesis) of *T. cruzi*.

Methods

Essential oils (EOs), (*E*)-cinnamaldehyde and Benznidazole

Essential oils of *Cinnamomum verum* (formerly *Cinnamomum zeylanicum*; Lauraceae; cinnamon) bark, *Citrus limon* (Rutaceae; lemon), *Cymbopogon nardus* (Poaceae; citronella grass), *Corymbia citriodora* (formerly *Eucalyptus citriodora*; Myrtaceae; lemon eucalyptus), *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae; blue gum), *Eugenia uniflora* (Myrtaceae; pitanga), *Myrocarpus frondosus* (Fabaceae; cabreúva), and *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae; rosemary) were purchased from QUINARI Cosmetic and Fragrances Inc. (Maringá-PR, Brazil). EOs from cinnamon and lemon eucalyptus were from lot 05209; EOs of pitanga, blue gum, cabreúva, and lemon were from lot 022186; citronella grass EO was from lot 519/520; and rosemary EO was from lot 022185. All EOs were valid until August 2012 and used from 2011–2012. Benznidazole and (*E*)-cinnamaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

EOs, (*E*)-cinnamaldehyde and benznidazole were first diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) at 100 mg/ml for EOs, 50 mg/ml for benznidazole (192.14 mM), and 13.216 mg/ml (100 mM) for (*E*)-cinnamaldehyde (first stock). For use, the first stock was diluted 1:50 (benznidazole) or 1:100 (EOs and cinnamaldehyde) in either LIT (liver infusion tryptose) or RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) media (second stock). Therefore, DMSO was diluted to 1%, ensuring that its final concentration in the experiments never exceeded 0.5%, a concentration that is not harmful to parasites and Vero cells. These stocks were stored at 4°C in the dark, to avoid degradation [23]. The second stock was prepared minutes before use.

Chemical composition of *Cinnamomum verum* essential oil

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed using a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph coupled with GCMS-QP2010 Plus equipped with auto sampler (model AOC-20i, Shimadzu, Columbia, MD, USA) and GC–MS Solution software. Analysis was performed with a Rtx-5MS capillary column (30 mm × 0.25 mm × 0.25 μm), using temperature programmed condition from 60°C to 250°C at 3°C/min. Analysis conditions were: injector temperature 250°C, ion source interface temperature 300°C, analysis of masses between 40–350 *m/z*, electron impact at 70 eV, column head pressure at constant pressure of 59 kPa, column flow 1.02 ml/min, gas linear velocity: 36.8 cm/s, carrier gas: helium, injected volume: 1 μl (1% dilution in hexane) in split mode (ratio 1:10). Constituents of the *C. verum* essential oil were identified by comparing their mass spectral pattern and retention indices (RI) relative to a standard *n*-alkane series (C₉–C₂₄) with those given in the literature [24] and the Wiley 138 and Nist 98 databases.

Evaluation of EO activity on *T. cruzi* epimastigotes

Epimastigotes (strain Dm28c) were maintained at 28°C in LIT medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), with weekly passages. For the screening of EO activity, epimastigotes were collected from cultures at the mid log phase of growth (3-days-old). Parasite concentration was adjusted to 1×10^7 cells/ml and 180 μ l/well were added to a 96 well plate (1.8×10^6 parasites/well). Then 20 μ l of compounds (final concentration: 5–300 μ g/ml for EOs, 0.26–39.65 μ g/ml [2–300 μ M] for (*E*)-cinnamaldehyde, and 6.25–150 μ g/ml [0.024–0.576 mM] for benzimidazole) were added to each well. In control wells, 20 μ l of culture medium were added without the compounds. The plates were incubated for 24 h at 28°C and then 50 μ l of MTT (at 10 mg/ml in PBS) was added to each well (final concentration: 2 mg/ml per well). The plates were wrapped in aluminum foil, incubated for 3 h at 37°C and then centrifuged at 475 *g* for 10 min. The supernatant was removed by abrupt plate inversion. Then 20 μ l of 10% SDS in 0.01 M HCl was added and the parasites were re-suspended by gently tapping the plates. The plates were then incubated at 37°C for 1 h. Thereafter, 80 μ l of pure DMSO was added to all wells to solubilize the formazan crystals. Optical density (OD) was read at 550 nm in an ELISA reader (Biotek model ELx800; Biotek, Winooski, VT, USA). Mean of at least two independent experiments was used to calculate the IC₅₀/24 h using Microsoft Excel software by linear correlation. Each experiment was performed in triplicate.

Evaluation of EO activity on *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes

Purified metacyclic trypomastigotes were obtained in vitro after nutritional stress in TAU3AAG medium, as previously described [25]. Briefly, 150 cm² bottles were inoculated with 5×10^6 epimastigotes/ml and after 72 h at 28°C metacyclic trypomastigotes were released into the supernatant. The cells were collected and purified by passage through an affinity column containing DEAE cellulose resin equilibrated with phosphate-saline-glucose buffer (PSG: 47.47 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM NaH₂PO₄·H₂O, 36.76 mM NaCl, 55.5 mM glucose). After purification, the concentration of trypomastigotes was adjusted to 5×10^6 cells/ml and they were distributed into 24-well plates containing TAU3AAG medium with different concentrations (0–20 μ g/ml) of *C. verum* EO. Cell lysis was determined after 24 h by counting parasite density with a Neubauer chamber. This density was used to calculate the IC₅₀/24 h (concentration leading to 50% cell lysis). The experiment was performed in triplicate.

Evaluation of EO activity on *T. cruzi* amastigotes

Vero cells (ATCC: CCL-81) were kept at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator, in 25 cm² culture flasks containing

RPMI-1640 medium pH 7.4 supplemented with 2.5% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 μ g/ml streptomycin and 10 μ g/ml penicillin. For the experiments, the cells were seeded into 24-well plates and then infected with trypomastigotes at a 10 parasites/cell ratio. After 4 h the monolayers were washed with PBS to remove non-internalized parasites and kept for 12 h at 37°C in 1 ml RPMI/2.5% FCS in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After that, the EOs were added to the RPMI medium at different concentrations (5–20 μ g/ml) and the plates were incubated for 24 h. The cells were then stained with Giemsa and the whole well (total of nine fields) was photographed in a Nikon TE300 inverted light microscope, with a 20 \times objective.

Amastigote counting was performed using ImageJ software, observing the percentage of infected cells, the number of amastigotes/cell, and the total number of amastigotes/well. Density of amastigote population was calculated dividing the total number of amastigotes/well by the well area (201 mm²). The percentage of inhibition (%) was calculated according to Guru et al. (1989) [26], as modified by Lakshmi and collaborators (2007) [27], using the following formula: %I = 100 – (T/C × 100), where T is the total number of intracellular amastigotes in treated cells and C is the total number of intracellular amastigotes in control cells. The IC₅₀/24 h value (concentration that inhibits proliferation of intracellular amastigotes by 50%) was estimated from the %I value with the Microsoft Excel software by linear correlation. Statistical analysis (one-way ANOVA) of the data was performed using the software GraphPad Prism Version 5.01 and data with *p* < 0.05 were considered significantly different. The experiment was performed in triplicate.

Evaluation of EO activity on *T. cruzi* metacyclogenesis

Epimastigotes at late log phase of growth (cell density of $5-7 \times 10^7$ cells/ml) were collected by centrifugation for 5 min at 7000 *g* at 10°C, resuspended in triatomine artificial urine (TAU) medium at 5.0×10^8 cells/ml and kept at 28°C for 2 h. Then, corresponding with nutritional stress, the cells were transferred to 25 cm² bottles containing 5 ml of TAU3AAG medium (final concentration of 5.0×10^6 cells/ml) with different concentration of *C. verum* EO (4–145 μ g/ml) and incubated at 28°C. After 24 h, the relative number of epimastigotes and trypomastigotes was counted with a Neubauer chamber and used to calculate the percentage of differentiation. Mean inhibition of differentiation for each concentration (as compared with metacyclogenesis in untreated control cultures) was used to calculate the IC₅₀/24 h using Microsoft Excel software by linear correlation. The experiment was performed in triplicate.

Cytotoxicity

Uninfected Vero cell monolayers were washed with PBS pH 7.2, detached by treatment with 0.25% trypsin/0.1%

EDTA for 5 minutes at 37°C, washed with RPMI medium pH 7.4 + 2.5% FCS, centrifuged at 0.2g for 10 min at 4°C and resuspended in the same medium. Cell viability was assessed by Trypan Blue staining and the cells were seeded into 96-well plates (2×10^4 cells/well). After 24 h, the cells were incubated with EOs or cinnamaldehyde at different concentrations (25–1000 µg/ml for EOs; 0.26–39.64 µg/ml [2–300 µM] for cinnamaldehyde). After 24 h of incubation, integrity of the cell monolayer was observed under an inverted microscope and 50 µl of MTT (at 2 mg/ml in PBS) was added. After 4 h of incubation, absorbance was read at 550 nm with an ELx800 (BioTek) microplate reader. The mean of at least two independent experiments was used to plot a graph of inhibition × concentration, which was used to calculate the CC₅₀ (50% cytotoxic concentration) using Microsoft Excel software by linear correlation. Each experiment was performed in triplicate.

Results

An initial screening of all EOs was performed on *T. cruzi* epimastigotes, evaluating inhibitory activity at concentrations of 50 µg/ml and 300 µg/ml. In this first trial, the EOs of *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus*, and *Corymbia citriodora* did not show activity at 300 µg/ml and were therefore not further evaluated.

Lower concentrations of the remaining EOs were then evaluated to estimate the IC₅₀/24 h (Table 1). The most effective EO was that of *C. verum* (IC₅₀/24.13 ± 1.13 µg/ml; IC₉₀/24 h = 48.33 µg/ml), followed by *M. frondosus* (IC₅₀/24 h = 60.87 ± 1.13 µg/ml), and *E. uniflora* (IC₅₀/24 h = 70 ± 1.04 µg/ml). The IC₅₀/24 h of the reference drug benznidazole was 15.8 ± 1.75 µg/ml (61 µM). Evaluation of cytotoxicity on Vero cells showed that the least cytotoxic EO was that of *C. limon* (CC₅₀/24 h = 281.69 ± 1.12 µg/ml). EOs with higher selectivity indexes were those from *C. limon* (SI = 2.63), *E. uniflora* (2.46), *M. frondosus* (2.32), and *C. verum* (2.05), but all were more cytotoxic and less selective than benznidazole (CC₅₀/24 h = 147.37 ± 1.22 µg/ml; SI = 9.33).

Since the *C. verum* EO was notably more effective on *T. cruzi* epimastigotes, it was selected for further evaluation on other developmental forms (trypomastigotes and amastigotes), as well as on the parasite differentiation process

(metacyclogenesis). Metacyclogenesis was not significantly affected by *C. verum* EO at concentrations up to 15 µg/ml. Higher concentrations led to reduction in percentage of trypomastigotes and metacyclogenesis was totally abolished with 25 µg/ml (IC₅₀/24 h = 18.2 ± 1.04 µg/ml). After 48 h of treatment with the IC₅₀/24 h value, the surviving cells showed slower motion compared with the control. After treatment for 24 h with 35 µg/ml ($2 \times$ IC₅₀/24 h) the few remaining cells (epimastigote forms) were motionless.

On purified metacyclic trypomastigotes, the estimated IC₅₀/24 h was 5.05 ± 1.03 µg/ml (IC₉₀ = 8.21 µg/ml), showing that this form is more susceptible than epimastigotes. The selectivity index (SI) increased more than 4-fold as compared with epimastigotes (9.78 and 2.05, respectively).

Vero cells were first infected and then incubated with *C. verum* EO, to assure that the effect was on amastigote proliferation and not on adhesion/penetration of the trypomastigotes used in the infection. Treatment with 20 µg/ml reduced the number of total amastigotes by 50% when compared with control infection, resulting in an IC₅₀/24 h value of 20 µg/ml (Table 2; Figures 1 and 2). The number of amastigotes/mm², the association index, and the percent inhibition (%) were also reduced by half, when compared with the untreated infection (Table 2). The mean number of amastigotes per cell decreased from 7.52 (untreated control) to 5.08 (Table 2; Figure 2).

GC-MS analysis identified five main constituents in *C. verum* EO, the major constituents being (*E*)-cinnamaldehyde (81.52%) and eugenol (16.68%), followed by (*E*)-caryophyllene, (*E*)-cinnamyl acetate, and α -humulene (Table 3). Since (*E*)-cinnamaldehyde was identified as the main constituent, it was further evaluated against *T. cruzi* epimastigotes and Vero cells, by the MTT colorimetric assay. However, it showed no activity or cytotoxicity at low concentrations up to 39.65 µg/ml (300 µM).

Discussion

Interest is growing in the search for natural compounds active against pathogenic trypanosomatids, resulting in several reports on the biological activity of essential oils (EOs) or their main constituents on these protozoa [6,18–20]. This activity is probably related to the function of EOs in nature, where they play a protective role in

Table 1 EO activity on *T. cruzi* (IC₅₀/24 h) epimastigotes and Vero cells (CC₅₀/24 h)

Essential oil	IC ₅₀ epimastigotes (µg/ml)	CC ₅₀ Vero cells (µg/ml)	Selectivity index (SI)
<i>Cinnamomum verum</i>	24.13 ± 1.13	49.4 ± 1.12	2.05
<i>Myrcarpus frondosus</i>	60.87 ± 1.13	141.3 ± 1.14	2.32
<i>Cymbopogon nardus</i>	94 ± 1.14	178.95 ± 1.1	1.90
<i>Citrus limon</i>	107.14 ± 1.03	281.69 ± 1.12	2.63
<i>Eugenia uniflora</i>	70 ± 1.04	172.42 ± 1.15	2.46
Benznidazole (reference drug)	15.8 ± 1.75 (61 µM)	147.37 ± 1.22	9.33

Table 2 Effect of *C. verum* EO on *T. cruzi* intracellular amastigotes after treatment for 24 h

	% Infected cells	Total intracellular amastigotes	Amastigotes/cell (mean)	Density amastigotes/mm ²	AI ^a	%I ^b
Control	59 (n = 5812)	25746	7.52	42.7	442.5	-
10 µg/ml	51.8 (n = 5709)	20315	6.87	33.7	355.87	21.1
20 µg/ml	50.6 (n = 4946)	12717	5.08	21.1	257.05	50.61

^aAssociation Index (AI) = % infected cells x amastigotes/cell.

^b% Inhibition (%) = 100 - (T/C x 100), where T is the total number of intracellular amastigotes in treated cells and C is the total number of intracellular amastigotes in control cells.

plants, acting as antibacterial, antiviral, antifungal, and protection against herbivory [9].

We have here first screened the activity of different EOs on *T. cruzi* culture epimastigotes, which are easier to grow and thus represent a simple model for the identification of potential compounds active against this parasite. However, in vitro activity against *T. cruzi* epimastigotes does not guarantee promising activity against other forms of the parasite. In fact, a considerable number of plant extracts with positive inhibitory effects in vitro do not become alternative chemotherapies [28]. Therefore, a large number of EOs or their constituents and derivatives should be analyzed, until a promising molecule acting on different developmental stages of *T. cruzi* can be obtained.

Among the eight essential oils that we analyzed, the *C. verum* EO showed the most activity against *T. cruzi* epimastigotes. It has been shown that *Cinnamomum* sp. EO has antipyretic, antibacterial, antifungal, antiparasitic, and repellent activities [9,28-31]. However, despite its good inhibitory activity on *T. cruzi*, its IC₅₀/24 h was still higher than that of the reference drug benznidazole, suggesting the need for high concentrations for in vivo studies. Nevertheless, it has been shown in treatment of mice that high concentrations of *Cymbopogon citratus* EO produce no toxic effects [32]. This finding indicates that EOs (or their main constituents) may have better activity in vivo than in vitro, with activity on parasitic infections and no cytotoxic activity [32,33]. Furthermore, treatment of mice with EOs showed beneficial

effects not related to the parasite infection, such as reductions in plasma cholesterol [32]. Therefore, *C. verum* EO (or cinnamaldehyde derivatives) is a potential candidate in the search for trypanocidal chemotherapeutic drugs.

Although it did not have the best selectivity index (SI) on epimastigotes, the *C. verum* EO was effective at a concentration much lower than that of the other EOs that we evaluated. It was also effective on *T. cruzi* epimastigotes at concentrations lower than those previously obtained with EOs from *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Achillea millefolium* (yarrow), *Syzygium aromaticum* (clove), *Ocimum basilicum* (basil), and *Cymbopogon citratus* (lemon grass), or their main constituents [18-20]. Activity of the *C. verum* EO was also higher than that obtained with other EOs used against other pathogenic trypanosomatids [14,16,17,34].

On *T. cruzi* amastigotes, the *C. verum* EO was effective with IC₅₀/24 h = 20 µg/ml (SI = 2.47), a value similar to that found with epimastigotes. Its activity was better than that obtained with jacaranone (main constituent of *Pentacalia desiderabilis*), which showed no activity on intracellular amastigotes of *T. cruzi* and *Leishmania chagasi* at a concentration of 100 µg/ml [35]. However, the IC₅₀/24 h value found here was four times higher than that obtained by Santoro and colleagues [18] with *Cymbopogon citratus* EO (IC₅₀/24 h = 5.1 µg/ml), although the SI was similar to that obtained with *Lippia alba* EO [36].

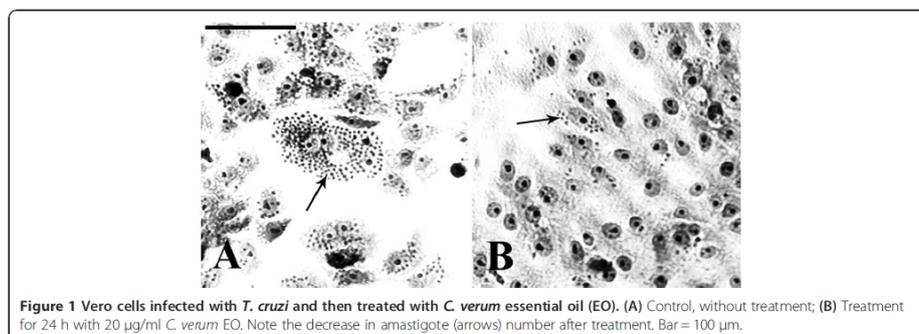
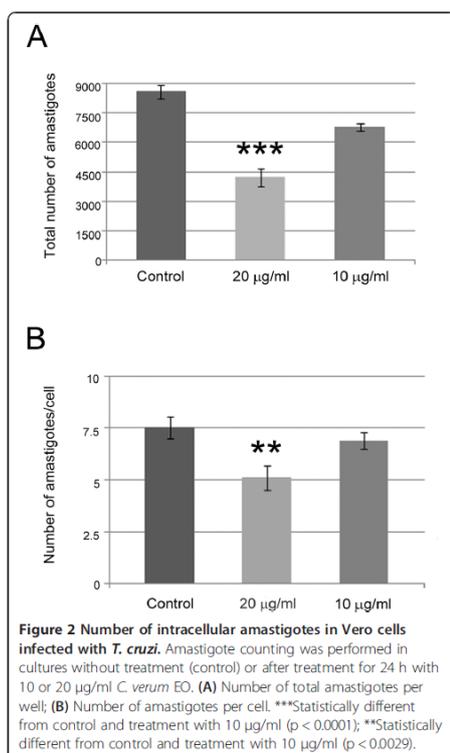


Figure 1 Vero cells infected with *T. cruzi* and then treated with *C. verum* essential oil (EO). (A) Control, without treatment; (B) Treatment for 24 h with 20 µg/ml *C. verum* EO. Note the decrease in amastigote (arrows) number after treatment. Bar = 100 µm.



It has been shown that citral, the main constituent of *Cymbopogon citratus* EO, was able to inhibit differentiation of *T. cruzi* at a concentration of 30.8 µg/ml [37]. Our data showed that *C. verum* EO also interfered with metacyclogenesis of this parasite. The differentiation process was totally inhibited with 25 µg/ml. At this concentration, only epimastigotes forms could be observed in the culture supernatant. Although it is possible that the EO was killing the trypomastigote forms, we cannot exclude the possibility that the inhibitory effect could be

also due to killing of epimastigotes prior to the differentiation process, thus lowering the number of resulting trypomastigotes.

The *C. verum* EO presented higher activity on *T. cruzi* purified metacyclic trypomastigotes, increasing the SI to 9.78. This increase in SI, as compared with epimastigotes, has been already observed [18,19]. Such difference may be related to diverse metabolic pathways and membrane composition in the various developmental forms of *T. cruzi*. It is also possible that the composition of the different culture media used for the various forms of *T. cruzi* (LIT, RPMI-1640 and TAU3AAG media) may influence absorption and/or degradation of the EOs.

Several factors, such as part of the plant from which the EO was extracted and season of cultivation, can alter the composition of an EO and the concentrations of each constituent [9-38]. Eugenol and cinnamaldehyde have been reported as the main constituents in EOs of *Cinnamomum* spp. [30,39,40]. Accordingly, our analysis by GC-MS of the *C. verum* EO used in our experiments also showed (*E*)-cinnamaldehyde (81.52%) and eugenol (16.68%) as main constituents.

Based on differences in the composition of the EO extracted from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*, Cheng et al. (2006) [30] classified it into six chemotypes, according to the main component. The cinnamaldehyde and cinnamaldehyde/cinnamyl acetate types had the strongest antifungal activity, because of a higher concentration of cinnamaldehyde. Singh and colleagues (2007) [40] also attributed the antifungal effect of *Cinnamomum zeylanicum* EO to the high concentration of cinnamaldehyde. The *C. verum* EO that we investigated had mostly cinnamaldehyde in its composition, which suggests that its activity could be related to this component. However, (*E*)-cinnamaldehyde was not effective against *T. cruzi* epimastigotes at low concentrations up to 300 µM (39.648 µg/ml). (*E*)-cinnamaldehyde was active against *T. brucei* trypomastigotes ($IC_{50} = 2.93$ µg/ml [41]), which indicates different susceptibilities among different pathogenic trypanosomatids and different developmental forms.

The tetrazolium dye MTT can be used to measure cytotoxicity (loss of viable cells: trypanocidal) or cytostatic activity (trypanostatic) of potential drugs. MTT reduction occurs via NAD(P)H-dependent oxidoreductase enzymes

Table 3 *Cinnamomum verum* EO constituents by GC-MS analysis

Constituent	Retention time	Concentration (%)	RI calc	RI lit
(<i>E</i>)-cinnamaldehyde	20.115	81.52	1282	1267
eugenol	23.713	16.68	1366	1356
(<i>E</i>)-caryophyllene	26.274	1.19	1426	1417
(<i>E</i>)-cinnamyl acetate	27.280	0.01	1450	1443
α -humulene	27.709	0.12	1460	1452

RI calc: Retention Index calculated; RI lit: Retention Index from the literature [24].

located largely in the cytosolic compartment of the cell [42,43]. MTT reduction is associated not only with mitochondria, but also with the cytoplasm and with non-mitochondrial membranes including the endosome/lysosome compartment and the plasma membrane [42]. Thus, low optical density of MTT staining can indicate low metabolic activity (trypanostatic) or low number of cells (trypanocidal). In our experiments, all plates were observed in inverted microscope before the MTT assay, to assess possible EO activity. In these observations we could see fewer cells and increased cellular debris (as compared with the untreated control) with increasing EO concentration (data not shown). Therefore, our data indicate that *C. verum* EO has a trypanocidal effect.

Activity of cinnamon EO could be associated with the lipophilic characteristic of its constituents. As typical lipophilic molecules, they cross the cell membrane and once inside the cells, cinnamaldehyde could interact with a variety of proteins, forming covalent bonds with amino acid residues, inactivating enzymes, and affecting a number of cellular activities. The mode of action against *T. cruzi* could be via addition of an aldehyde thiol to sulfur-containing components in the key enzymes trypanothione and trypanothione reductase [41], which would lead to a redox imbalance (detected by the MTT assay). Therefore, it is possible that *C. verum* EO acts inside trypanosomes by promoting redox imbalance in the cytosol.

Conclusions

Biological activity of eight different essential oils was screened against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. The essential oils of *C. verum*, *M. frondosus*, and *E. uniflora* showed the best activity and are promising agents that deserve further study. *C. verum* essential oil was effective on the three developmental forms of *T. cruzi* (epimastigotes, trypomastigotes, and amastigotes) and on the in vitro differentiation of this parasite. *C. verum* essential oil was as effective as, or more effective than, other essential oils or their main constituents tested on trypanosomatids. Evaluation of cinnamaldehyde derivatives is as a potential strategy for further studies to find increased selectivity on *T. cruzi* and identification of the mode of action against this parasite.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CMOA carried out the biological evaluation on *T. cruzi* and Vero cells and drafted the manuscript. TGS and BHLNSM acquired and analyzed the GC-MS data. MJS conceived the study, participated in its design and edited the final version of the manuscript. All authors had approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). The authors thank the Laboratory of Natural Products and Chemical Ecology in the Department of Chemistry at the Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba-PR, Brazil, for the GC-MS analysis. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS)-FIOCRUZ for use of the RPT07C-Confocal Microscopy Facility at Carlos Chagas Institute/Fiocruz, Curitiba-PR, Brazil).

Author details

¹Laboratory of Cell Biology, Carlos Chagas Institute/Fiocruz, Rua Prof. Alcacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil. ²Laboratory of Natural Products and Chemical Ecology, Department of Chemistry, Federal University of Paraná (UFPR), 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

Received: 24 January 2014 Accepted: 20 August 2014
Published: 22 August 2014

References

1. World Health Organization (WHO): Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet n° 340, updated March 2014. [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/]. Accessed August 06, 2014.
2. Urbina JA: Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* 2010, **115**:55-68.
3. Coura JR: Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:113-122.
4. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA: Chagas disease. *Postgrad Med J* 2006, **82**:788-798.
5. Coura JR: Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**:549-554.
6. Alviano DS, Barreto ALS, Dias FA, Rodrigues IA, Rosa MSS, Alviano CS, Soares RMA: Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Front Microbiol* 2012, **3**:283.
7. 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, Ogunjibe 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**(Suppl 14):2128-2175.
8. Wink M: Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 2012, **17**:12771-12791.
9. Bakkali F, Averbek S, Averbek D, Idaomar M: Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol* 2008, **46**:446-475.
10. Bassolé IHN, Juliani HR: Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2008, **17**:3989-4006.
11. Hammer KA, Carson CF, Riley TV: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999, **86**:985-990.
12. Lima JO, Oliveira RAG, Lima EQ, Farias NMP, De Souza EL: Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn* 2006, **16**:197-201.
13. York T, van Vuuren SF, de Wet H: An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. *J Ethnopharmacol* 2012, **144**:118-127.
14. Habila N, Agbaju AS, Ladan Z, Bello IA, Haruna E, Dakare MA, Atolagbe TO: Evaluation of in vitro activity of essential oil against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma evansi*. *J Parasitol Res* 2010, **2010**:534601.
15. Misra P, Kumar A, Khare P, Gupta S, Kumar N, Dube A: Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. *J Med Microbiol* 2009, **58**:1058-1066.
16. Medeiros MGF, Silva AC, Cito AMGL, Borges AR, Lima SG, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ: In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int* 2011, **60**:237-241.
17. Oliveira VCS, Moura DMS, Lopes JAD, Andrade PP, Silva NH, Figueiredo RCBQ: Effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol Res* 2008, **104**:1053-1059.
18. Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Freire JM, Soares MJ: Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

- (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology* 2007, **131**:1649–1656.
19. Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Mendonça LZ, Soares MJ: *Trypanosoma cruzi*: activity of the essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2007, **116**:283–290.
 20. Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Salgado APSP, Menna-Barreto RFS, Soares MJ: Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res* 2007, **100**:783–790.
 21. Santos KKA, Matias EFF, Tintino SR, Souza CES, Braga MFBM, Guedes GMM, Rolón M, Veja C, Arias AR, Costa JGM, Menezes IRA, Coutinho HDM: Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp Parasitol* 2012, **131**:130–132.
 22. Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA, Maza PK, Prado Dias Filho B, Cortez DAD, Alviano DS, Rosa MS, Lopes AH, Alviano CS, Nakamura CV: Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int* 2006, **55**:99–105.
 23. Guimarães LGL, Cardoso MG, Zacaroni LM, Lima RK, Pimentel F, Morais AR: Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). *Quim Nova* 2008, **31**:1476–1480.
 24. Adams RP: *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. 4th edition. IL, USA: Edited by Allured Publishing Corporation; 2007.
 25. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S: In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985, **16**:315–327.
 26. Guru PY, Agrawal AK, Singha UK, Singhal A, Gupta CM: Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tuftsin-bearing liposomes as drug vehicles. *FEBS Lett* 1989, **245**:204–208.
 27. Lakshmi V, Pandey K, Kapil A, Singh N, Samant M, Dube A: In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum bicnecariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. *Phytomedicine* 2007, **14**:36–42.
 28. Lirussi D, Li J, Prieto JM, Gennari M, Buschiazzo H, Rios JL, Zaidenberg A: Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in chinese medicine. *Fitoterapia* 2004, **75**:718–723.
 29. Anthony JP, Fyfe L, Smith H: Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol* 2005, **21**:462–468.
 30. Cheng SS, Liu JY, Hsui YR, Chang ST: Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour Technol* 2006, **97**:306–312.
 31. Kalemba D, Kunicka A: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 2003, **10**:813–829.
 32. Costa CAR, Bidinotto LT, Takahira RK, Salvadori DMF, Barbisan LF, Costa M: Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food Chem Toxicol* 2011, **49**:2268–2272.
 33. Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKJ, Katzin AM, Ulliana SRB: Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother* 2009, **6**:643–649.
 34. Parreira NA, Magalhães LG, Morais DR, Caixeta SC, Sousa JPB, Bastos JK, Cunha WR, Silva MLA, Nanayakkara NPD, Rodrigues V, Silva Filho AA: Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodivers* 2010, **7**:1–10.
 35. Morais TR, Romoff P, Fávero A, Reimão JQ, Lourenço WC, Tempone AG, Histov AD, Santi SM, Lago JHG, Sartorelli P, Ferreira MJP: Anti-malarial, anti-trypanosomal and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). *Parasitol Res* 2012, **110**:95–101.
 36. Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martínez JR, Stashenko E: Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, **105**:184–190.
 37. Cardoso J, Soares MJ: In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, **105**:1026–1032.
 38. Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, Da Silva WP, Motta AS, Nascente OS: Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chem Toxicol* 2012, **50**:2668–2674.
 39. Jayaprakasha GK, Mohan Rao LJ, Sakariah KK: Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 2003, **51**:4344–4348.
 40. Singh G, Maurya S, Lampasona MP, Catalan CAN: A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol* 2007, **45**:1650–1661.
 41. Nibret E, Wink M: Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymlifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine* 2010, **17**:911–920.
 42. Berridge MV, Herst PM, Tan AS: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005, **11**:127–152.
 43. Berridge MV, Tan AS: Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives Biochem Biophys* 1993, **303**:474–482.

doi:10.1186/1472-6882-14-309

Cite this article as: Azereido et al.: In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 **14**:309.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





RESEARCH LETTER – Pathogens & Pathogenicity

Biological activity of the azlactone derivative EPA-35 against *Trypanosoma cruzi*

Camila Maria Oliveira de Azeredo¹, Eloah Pereira Ávila², Danielle Lobo Justo Pinheiro², Giovanni Wilson Amarante² and Maurilio José Soares^{1,*}

¹Laboratory of Cell Biology, Carlos Chagas Institute/Fiocruz-PR, 81350-010 Curitiba-PR, Brazil and ²Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

*Corresponding author: Laboratory of Cell Biology, Carlos Chagas Institute/Fiocruz-PR, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba-PR, Brazil. Tel: (+55) (41) 3316-3240; E-mail: maurilio@fiocruz.br

One sentence summary: The azlactone EPA-35 is effective against *Trypanosoma cruzi*.

Editor: Albert Descoteaux

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects six to seven million people worldwide. Treatment is based on benznidazole, producing several side effects and debatable efficacy, highlighting the need for new alternative drugs. We investigated the activity of four C-4 functionalized azlactone derivatives (EPA-27, EPA-35, EPA-63 and EPA-91) as potential *T. cruzi* inhibitors. Screening with epimastigotes indicated EPA-35 as the best compound (IC₅₀/24 h: 33 μM). This compound was 14.1 times more potent against intracellular amastigotes (IC₅₀/24 h: 2.34 μM). Treatment of infected Vero cells for 72 h (up to 30 μM EPA-35) resulted in a dose-dependent decrease in number of trypomastigotes and amastigotes released in the supernatant, but the amastigote/trypomastigote ratio remained constant, indicating that amastigote growth was disturbed, but cell differentiation was unaffected. Analysis of treated epimastigotes by flow cytometry indicated that the plasma membrane remained intact, but there was a significant decrease in mitochondrial membrane potential. The pattern of cell distribution in the cell cycle stages (G1, G2, M) was unaltered in treated epimastigotes, indicating a trypanocidal rather than a trypanostatic activity. Scanning electron microscopy and flow cytometry showed epimastigotes with a round shape and decrease in cell size. Taken together, our data indicate that the EPA-35 is effective against *T. cruzi*. Synthetic transformation of EPA-35 into other derivatives may provide promising compounds for further evaluation against this parasite.

Keywords: amastigote; azlactone; cytotoxicity; *Trypanosoma cruzi*; trypanocidal; synthetic derivatives

INTRODUCTION

The flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease, which is a chronic disease endemic in Latin America, affects six to seven million people worldwide (WHO 2016). Chagas disease represents a significant human health problem on the American continent in terms of both its socioeconomic impact and geographical distribution (Bermudez *et al.* 2016).

Human disease results from invasion of the natural ecotopes and establishment of vectors in human dwellings found in poor

socioeconomic conditions of rural populations (Urbina 2010). Blood transfusion, congenital transmission, and increased migration rates have promoted the spread of the disease to non-endemic regions, such as the United States and Western Europe (Schmunis and Yadon 2010; Urbina 2010; WHO 2016). Currently, benznidazole (BZN) and nifurtimox (NFX) are available for Chagas disease treatment during acute and initial chronic phases (Coura 2009; Urbina 2010). However, BZN and NFX do not satisfy the World Health Organization (WHO) criteria for an ideal drug: (i) parasitological cure in acute and chronic cases of infection;

Received: 22 August 2016; Accepted: 24 January 2017

© FEMS 2017. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

(ii) effectiveness in a single dose or a few doses; (iii) accessibility to patients; (iv) no teratogenic or side effects; (v) no need for hospitalization of patients for treatment; (vi) no induction of resistance to the etiological agent (Coura 2009; Urbina 2010).

With new cases in endemic regions and recent cases of the disease spreading into non-endemic regions (WHO 2016), new drugs are needed to effectively treat both the disease and prophylaxis of *T. cruzi* in blood banks. Therefore, alternative compounds to treat Chagas disease are needed.

Oxazolones are five-membered heterocyclic compounds with nitrogen and oxygen as heteroatoms (Bala, Saini and Kamboj 2011; Sharma et al. 2015). Oxazolones are important synthons for the synthesis of biologically active compounds and key pharmacophores of synthesized drugs (Sharma et al. 2015). Oxazol-5(4H)-ones, also known as azlactones, are readily prepared from N-protected amino acids (Ávila et al. 2013, 2015; Pereira et al. 2014; Barbosa, Teixeira and Amarante 2015; Pinheiro et al. 2016). Because of their easy availability and diverse reactions, azlactones have many possibilities as building blocks for many important commercial products, such as drugs (Mukerjee 1987; Bala, Saini and Kamboj 2011).

Erlenmeyer azlactones have been involved in a series of biological activities, with anti-inflammatory, antimicrobial, anti-HIV, anti-angiogenic, anticonvulsant and antitumoral properties (Bala, Saini and Kamboj 2011). Some oxazolone derivatives have tyrosinase inhibitory properties (Khan et al. 2006; Abdel-Aty 2009; Bala et al. 2012) and fungitoxic effect, probably due to their mutagenic potential during *in vitro* DNA synthesis (Abdel-Aty 2009). They also exhibit promising photochemical activity and cyclooxygenase-2 inhibitory property (Bala et al. 2012). Spirocyclopropyl oxazolones are a family of compounds that represents a class of inhibitors of herpes proteases (Witvrouw et al. 1999).

Here we investigated whether C-4 functionalized azlactone derivatives have trypanocidal activity. As far as we know, this is the first report regarding the anti-trypanosomatid activity of these compounds. The activity of four synthetic azlactone derivatives was here evaluated on the epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*.

MATERIAL AND METHODS

Compounds

The azlactone derivatives EPA-27, EPA-35, EPA-63 and EPA-91 were synthesized as previously described (products 3g, 3e, 3a and 3f, respectively) by Ávila et al. (2013). In summary, the reactions were performed using azlactone derivatives, enones and catalytic amounts of (\pm)-camphorsulfonic acid under room temperature with toluene as the solvent.

For bioassays, compounds were first diluted to 100 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted to 10 mM in DMSO. This second solution was further diluted to several concentrations in Liver Infusion Tryptose (LIT, Camargo 1964) medium for the experiments, with final concentration of DMSO never exceeding 1%.

Vero cells

Vero cells (ATCC: CCL-81) were kept at 37°C and 5% CO₂ in a humidified CO₂ incubator in 25 cm² culture flasks containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) pH 7.4 with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 100 IU ml⁻¹ penicillin. For the bioassays, cell monolayers were washed with PBS and treated for 5 min with 0.25%

trypsin and 0.1% EDTA. Then, cells were washed with DMEM, centrifuged for 4 min at 700 rpm and resuspended in the same medium. Next, 2 × 10⁴ cells per well were seeded in 96-well plates for the cytotoxicity assays, or 6 × 10⁴ cells per well in 24-well plates to measure anti-parasitic activity. After 12 h, cell cultures were used for subsequent experiments.

Parasites

Trypanosoma cruzi clone Dm28c epimastigotes were kept at 28°C in LIT medium supplemented with 10% FBS and passaged every 3 to 4 days. Cell-derived trypomastigotes were collected 3 to 4 days post-infection from the supernatant of infected Vero cell cultures by centrifugation for 10 min at 3000 × g. Cells were resuspended in DMEM and used for host cell re-infections at a ratio of 10 trypomastigotes per cell.

To obtain intracellular amastigotes, Vero cells previously seeded in 24-well plates were infected with trypomastigotes. After 4 h, wells were washed with PBS and kept for 24 h at 37°C and 5% CO₂ in 1 ml of DMEM and then used in the experiments.

Cytotoxicity assay

Vero cell cultures were incubated for 24 or 72 h with serial dilutions of EPA-35 (500–15.6 µM), under the same conditions described above. For BZN, the tested concentrations were 1, 10, 100 or 1000 µg ml⁻¹ (3.84, 38.42, 384.27 and 3842.70 µM, respectively). Cytotoxicity (CC₅₀) was evaluated by MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) colorimetric assay, as previously described (Azeredo et al. 2014). The concentration that kills 50% of the cell population (CC₅₀) after 24 or 72 h treatment was estimated from an average of a technical triplicate by non-linear regression using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Screening compounds against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes

To calculate the inhibitory concentration that kills 50% of the cell population (IC₅₀) after 24 h, 3-day-old culture epimastigotes in LIT medium (1 × 10⁷ cells ml⁻¹) were seeded into 96-well plates (180 µl well⁻¹) and incubated with serial dilutions (100–12.5 µM) of EPA-27, EPA-35, EPA-63 or EPA-91. BZN (50–6.25 µM) and 1% DMSO were used as positive and negative controls, respectively. The antiparasitic activity was assessed by the MTT assay as previously described (Azeredo et al. 2014). The IC₅₀/24 h value was estimated from a technical triplicate by non-linear regression using the GraphPad Prism 5.0 software. The compound with the highest selectivity index (SI is CC₅₀/24 h / IC₅₀/24 h) was selected for further analysis on amastigotes.

Activity on *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes

To assess the effect on intracellular amastigotes, infected Vero cells were incubated for 24 h with serial dilutions of EPA-35 (30–3.75 µM), in a final volume of 200 µl well⁻¹. BZN (serially diluted from 60 to 7.5 µM) and 1% DMSO were used as controls. The plates were then washed with PBS, fixed with methanol and stained with Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany). To evaluate trypanocidal activity, 100 host cells per well were randomly selected by inverted microscopy and the total number of intracellular amastigotes was estimated. The values obtained were expressed as percent inhibition [PI is 100 – (T/C × 100)], where T is the average number of total intracellular

amastigotes in treated cells and C is the average number of total intracellular amastigotes in control cells. The $IC_{50}/24$ h values were estimated from the PI values obtained from a technical triplicate and analyzed using the GraphPad Prism 5.0 software.

To assess the activity of EPA-35 on the intracellular differentiation (amastigote to trypomastigote), infected Vero cell cultures were treated with 3.75–30 μ M EPA-35. Supernatants were collected after 72 h and the number of released trypomastigotes and amastigotes was estimated by counting in a Neubauer chamber. The amastigote to trypomastigote ratio was determined with CompuSyn software (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA). Host cell cytotoxicity after 72 h was determined as described above. Experiments were performed in technical triplicate, and statistical analysis was made using ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test with GraphPad Prism 5.0 software.

Flow cytometry

All experiments were performed with a FACScanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) flow cytometer. Approximately 20 000 events were collected for each assay (SSC \times FSC visualization of population, ungated). Data were analyzed with FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by a Tukey-Kramer multiple comparisons test using GraphPad Prism 5.0 software for all parameters evaluated. All experiments were performed in technical triplicate. For all experiments, 1×10^6 epimastigotes were previously treated for 24 h with 15, 30 or 50 μ M EPA-35 or else with 33 μ M or 66 μ M EPA-35; the epimastigotes were then centrifuged for 1 min at $7000 \times g$ and washed with 1 ml of PBS.

To estimate mitochondrial membrane potential (ψ m), treated epimastigotes were incubated for 15 min at 28°C with 10 μ g ml^{-1} rhodamine-123 (Rhd) and then washed three times in PBS (Kessler et al. 2013). Fluorescence was quantified with a 530/30 nm filter. Positive control was made with 50 μ M carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP; Sigma, St Louis, MO, USA). Cell size alteration was estimated from the FSC-A parameter.

To determine plasma membrane integrity, epimastigotes were rinsed with PBS and then stained with 5 μ g ml^{-1} propidium iodide (PI) for 10 min at room temperature (Kessler et al. 2013). PI staining was quantified with a 585/42 nm filter.

To evaluate the cell division cycle, epimastigotes were suspended in 1 ml of DNA staining solution (3.4 mM Tris-HCl, 0.075 mM PI, 0.1% NP-40, 10 mM NaCl and 700 U/L RNase A), as previously described (Di Paola et al. 2010). Cells were kept on ice until analysis. Analysis were performed on single-epimastigotes gate (FSC-W \times FSC-H), for exclusion of doublets.

Scanning electron microscopy

Epimastigotes were treated for 24 h with 33 μ M or 66 μ M EPA-35, washed with PBS and fixed for 40 min with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2. The parasites were washed in the same buffer and adhered for 10 min to glass coverslips coated with 0.1% poly-L-lysine. They were then post-fixed for 10 min in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ascending acetone series and critical point dried. The coverslips were adhered to scanning electron microscopy (SEM) stubs and coated with a 20-nm-thick gold layer. Samples were observed in a Jeol JSM 6010PLUS-LA scanning electron microscope at 20 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

The azlactone derivatives EPA-27, EPA-35, EPA-63 and EPA-91 were successfully synthesized under catalytic, metal-free conditions. The yields were moderate to good, ranging from 60% to 80%, in near perfect control of both regio- and diastereoselectivities (only 1.4-addition and >20:1 dr). Chemical structures of the products are shown in Fig. 1. Oxazolones derivatives have a broad spectrum of biological activities (Bala, Saini and Kamboj 2011; Sharma et al. 2015), including antimicrobial (Siddiqui et al. 2001; Desai, Bhavsar and Baldaniya 2009), anti-fungal (Desai, Bhavsar and Baldaniya 2009; Bala et al. 2012) and anti-cancer (Han et al. 2005; Jat, Mishra and Pathak 2012) activities. However, this is the first report of azlactones tested against a trypanosomatid protozoan.

All four compounds were first screened against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. After incubation for 24 h, the most effective compound was EPA-35 (Table 1; Fig. S1, Supporting Information), with an SI of 6.74 ($IC_{50}/24$ h: 33 μ M; $CC_{50}/24$ h: 222.4 μ M). The other three compounds (EPA-27, EPA-63 and EPA-91) were ineffective up to 100 μ M. On the other hand, BZN had an SI of 223.68 ($IC_{50}/24$ h: 12.16 μ M; $CC_{50}/24$ h: 2720 μ M).

Because EPA-35 gave the best results against epimastigotes, it was further evaluated *in vitro* on intracellular amastigotes in

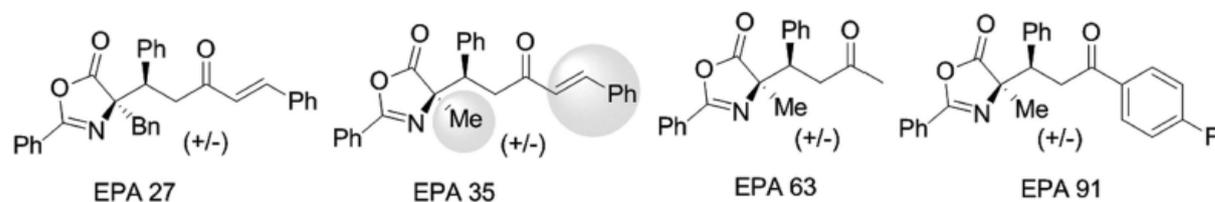


Figure 1. Chemical structure of the four azlactone derivatives evaluated in this work.

Table 1. Activity of EPA-35 and BZN on *T. cruzi* epimastigotes (Epi) and intracellular amastigotes (Ama), with cytotoxicity on Vero cells (Vero).

	$IC_{50}/24$ h Epi (μ M)	$IC_{50}/24$ h Ama (μ M)	$CC_{50}/24$ h Vero (μ M)	$CC_{50}/72$ h Vero (μ M)	SI Epi (24 h)	SI Ama (24 h)
EPA-35	33	2.34	222.4	404.6	6.74	95.04
BZN	12.16	6.86	2720	3842.70	223.68	396.50

SI is $CC_{50}/24$ h / $IC_{50}/24$ h.

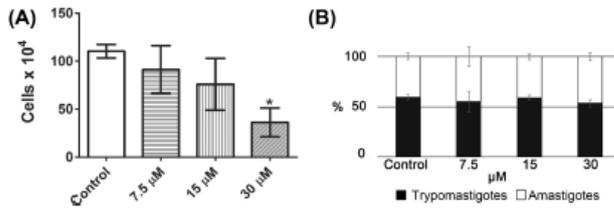


Figure 2. Effect of EPA-35 on intracellular differentiation of *T. cruzi* amastigotes after incubation for 72 h. (A) Mean number of released parasites (amastigotes + trypomastigotes) in the supernatant of treated and untreated (control) infected Vero cell cultures. (B) Relative percentage of trypomastigotes and amastigotes released in the supernatant of treated and untreated infected Vero cell cultures. *Significantly different from untreated infections ($P < 0.05$).

which it was 14.1 times more potent, when compared to the activity on epimastigotes (Table 1; Fig. S2, Supporting Information), with an SI of 95.04 ($IC_{50}/24$ h: 2.34 μM; $CC_{50}/24$ h: 222.4 μM). The reference drug BZN had an SI of 396.5 ($IC_{50}/24$ h: 6.86 μM; $CC_{50}/24$ h: 2720 μM) on this developmental form (only 4.17 times higher than EPA-35).

An increase in selectivity of essential oils toward amastigotes has already been shown (Santoro et al. 2007; Medeiros et al. 2011; Azeredo et al. 2014), highlighting the need to evaluate candidate compounds on the more clinically relevant amastigotes. Regarding the chemical structure of the four synthesized azlactone analogs, the presence of a methyl group at the stereogenic center (C-4 substitution) and a conjugate double bond seems pivotal for the highest biological activity of EPA-35. Oxazolones are used in the manufacturing of various biologically active drugs and the substitution of a functional group at the C-4 and C-2 positions is vital in the activity of these compounds (Bala, Saini and Kamboj 2011). The four functionalized azlactones used here were expected to present a higher extension of conjugation, due to the presence of one more double bond external to the heterocyclic ring. The best activity of EPA-35 could be attributed to its higher conjugation and to a more appropriate molecular con-

formation due to the presence of a methyl group as side chain. It has been shown that azlactones present mutagenic potential on DNA synthesis (Abdel-Aty 2009) and are potent inhibitors of methionylRNA synthetase (Abdel-Aty 2009). Therefore, EPA-35 could be acting on DNA synthesis of the parasites.

Infected Vero cells were submitted to EPA-35 treatment (up to 30 μM), and the the release of amastigotes/trypomastigotes in the supernatant was quantified after 72 h of incubation. There was a dose-dependent decrease in the mean parasite count (Fig. 2A), but the amastigotes to trypomastigote ratio remained constant (Fig. 2B), indicating that the effect was on amastigotes growth, but not on amastigote differentiation. Incubation of uninfected Vero cells for 72 h with EPA-35 resulted in a $CC_{50}/72$ h value of 404.6 μM, whereas BZN did not induce cytotoxicity in concentrations as high as 3842.70 μM. Therefore, the dose-dependent decrease in the mean parasite number in the supernatant of infected cultures cannot be attributed to cytotoxicity to the host cells.

Cell division cycle analysis by flow cytometry with epimastigotes (*T. cruzi* proliferative forms, as amastigotes) showed that EPA-35 did not arrest the cell cycle at any phase after a 24 h treatment (Fig. S3A, Supporting Information), indicating that cell division was not affected. Counting the number of epimastigotes after a 24 h treatment showed a reduction in cell number (Fig. S3B). This result also confirms that the decrease in trypomastigotes/amastigotes number in the supernatant of infected Vero cell cultures was probably due to a trypanocidal activity of the compound on the intracellular amastigotes, rather than trypanostatic.

Analysis of epimastigotes treated with EPA-35 and then stained with Rhd showed a significant decrease in the ψ_{mas} measured by flow cytometry (Fig. 3A and B), indicating that EPA-35 acts on the parasite mitochondrion. Treatment with BZN also induced a significant alteration in ψ_m (Fig. 3D and E), but only at 24 μM ($2 \times IC_{50}/24$ h). However, the possibility remains that this is a downstream effect due to another target. Trypanosomatids have to maintain the transmembrane potential of a single

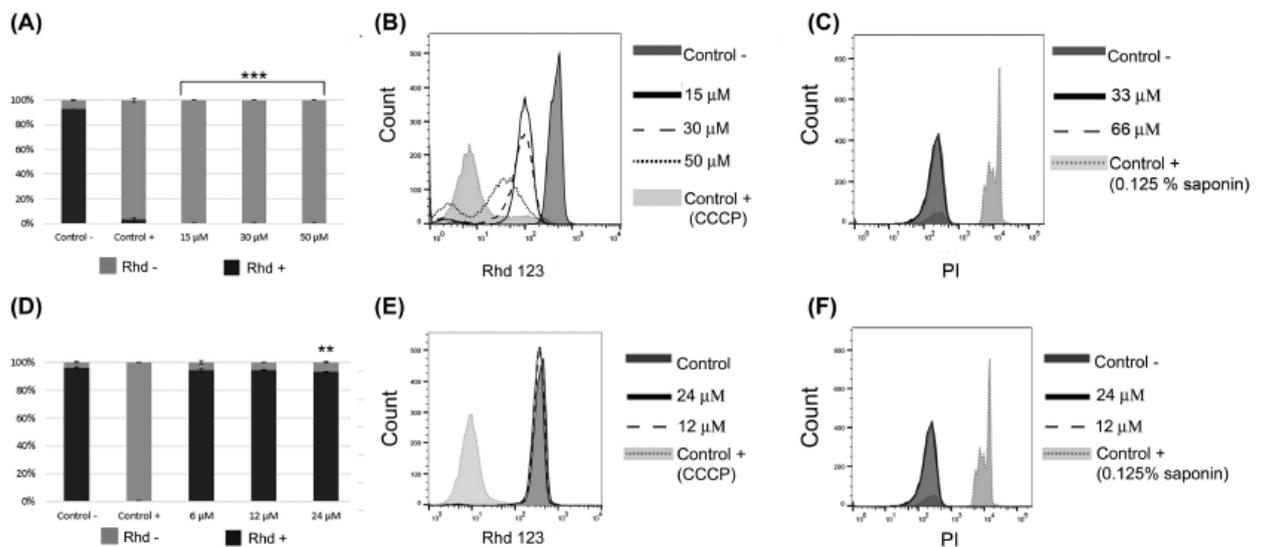


Figure 3. Mitochondrial potential and cell membrane integrity (ψ_m) of *T. cruzi* epimastigotes treated with EPA-35 (A-C) or BZN (D-F). (A) Percentage of viable and non-viable cells according to Rhodamine-123(Rhd) staining. Positive control is 50 μM CCCP. All treatments induced significant decrease in mitochondrial staining, compared to untreated (control-) cells ($***P < 0.0001$). (B) Representative histogram of an experiment after Rhd staining. (C) Representative histogram of PI staining. (D) Percentage of viable and non-viable cells after treatment with BZN, according to Rhd staining. Positive control is 50 μM CCCP. ($**P < 0.05$). (E) Representative histogram of Rhd staining after BZN treatment. (F) Representative histogram of epimastigotes labeled with PI after BZN treatment.

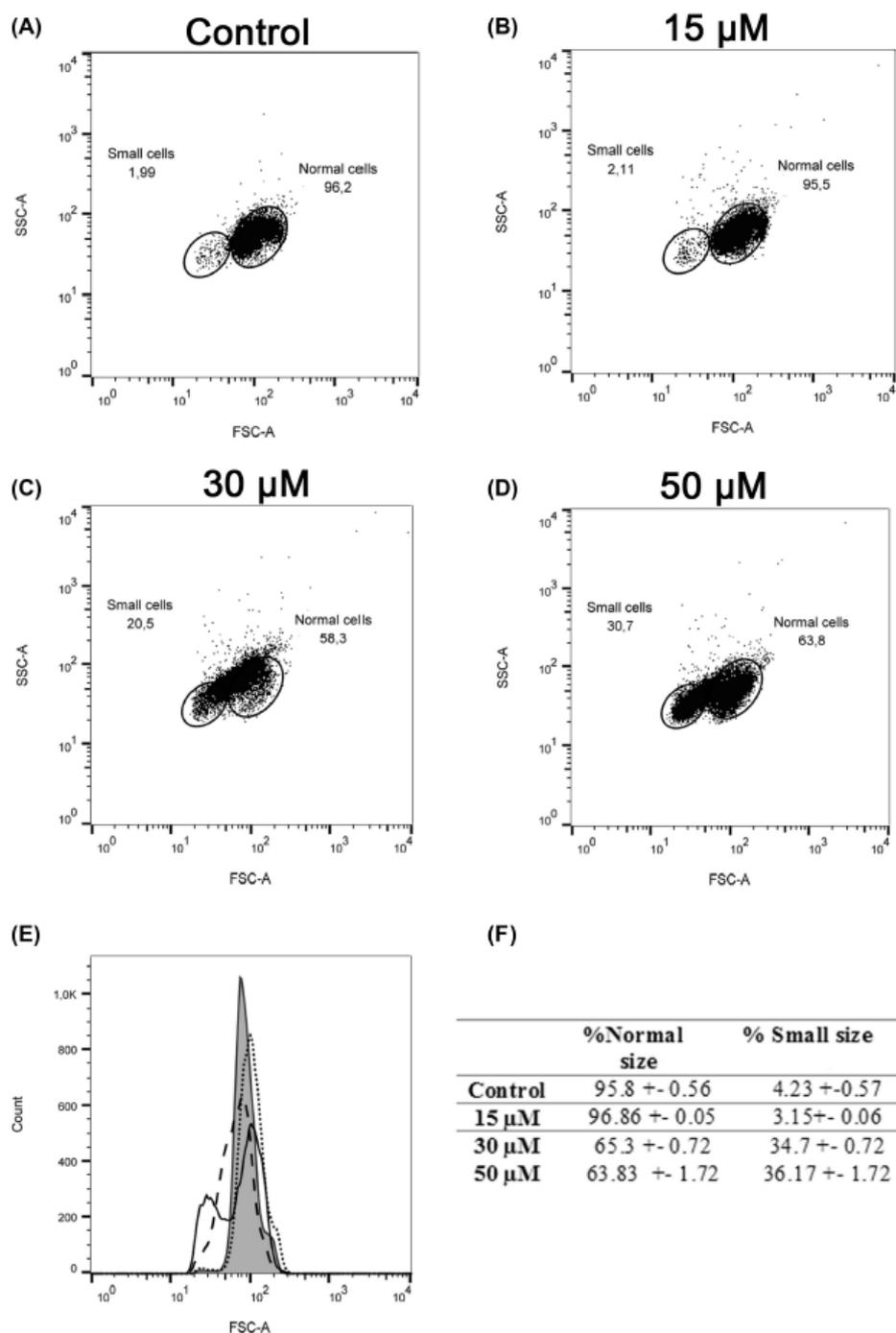


Figure 4. Treatment with EPA-35 affects epimastigote size in a dose-dependent manner. (A–D) Representative dotplot graphs (FSC-A), without (control) or with EPA-35 treatment (15, 30 or 50 μM), after Rhodamine 123 staining. Gates were designed using control cells as a cell size standard. (E) Representative histogram of cell size distribution after EPA-35 treatment. Gray: control; dotted line: 15 μM; dashed line: 30 μM; solid line: 50 μM. (F) Percentage of cells within the normal size and small size gates. Mean and standard deviation of three representative experiments.

mitochondrion for parasite survival (Garcia et al. 2013; Menna-Barreto and Castro 2014), which makes this organelle an important target for drug therapy.

EPA-35-treated epimastigotes incubated with PI showed no DNA labeling, indicating that the parasite cell membrane remained intact after 24 h treatment (Fig. 3C). BZN treatment also did not cause any significant change in PI staining (Fig. 3F).

Treatments with 30 μM or 50 μM EPA-35 led to an 8-fold increase in the number of smaller cells, when compared to untreated epimastigotes (Fig. 4). By SEM, *T. cruzi* epimastigotes treated with 33 μM EPA-35 (IC₅₀/24 h) presented a round shape with an apparent decrease in cell size (Fig. 5C and D) when compared to untreated control cells (Fig. 5A and B). When cells were treated with 66 μM (2 × IC₅₀/24 h), the same morphological

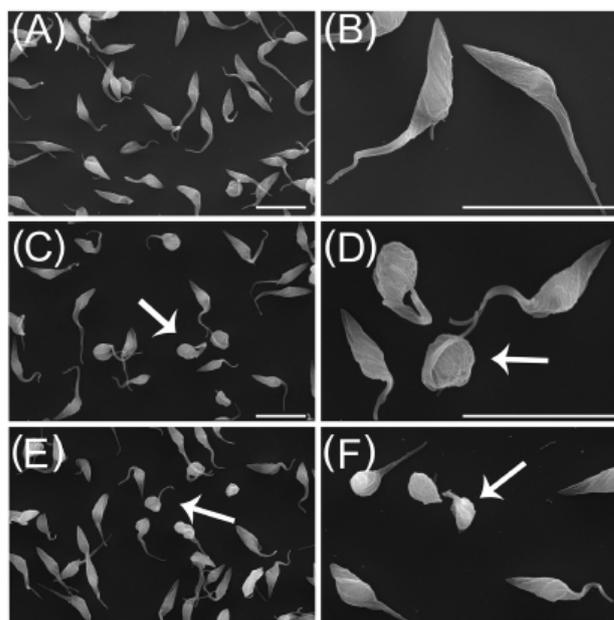


Figure 5. SEM of *T. cruzi* epimastigotes treated with EPA-35. (A and B) Untreated control. (C and D) Incubation with $IC_{50}/24$ h EPA-35 ($33 \mu\text{M}$). (E and F) Incubation with $2 \times IC_{50}/24$ h EPA-35 ($66 \mu\text{M}$). White arrows point to parasites with morphological alterations. Bar is $10 \mu\text{m}$.

alterations were observed (Fig. 5E and F). Possibly some cytoskeleton changes occur in treated parasites resulting in loss of normal morphology with rounded/wrinkled appearance, that leads to the decrease in cell size observed by cytometry (FSC) The structural alteration is not due to cytoplasmic leakage from a pore phenotype in the plasma membrane, because this phenotype was not observed by flow cytometry (PI) or morphologically by SEM.

Lack of PI staining, added to decrease in cell size and ψm disruption, could indicate apoptosis as cell death mechanism (Jiménez-Ruiz et al. 2010; Proto, Coombs and Mottram 2013). However, it has been suggested that cell death in parasitic protozoa should be classified as non-regulated necrosis, since no death receptors and signaling pathways consistent with any type of programmed cell death are efficiently identified in these organisms (Proto, Coombs and Mottram 2013).

In conclusion, our data indicate that the azlactone derivative EPA-35 was active against *T. cruzi*. Although this does not justify clinical use in EPA-35 current form, EPA-35 is a promising compound for further evaluation against this parasite. Further studies on the synthetic transformation of EPA-35 into other derivatives may yield a compound with reduced cytotoxicity and enhanced activity against *T. cruzi*.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at FEMSLE online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS FIOCRUZ for the use of its facilities (Platforms RPT08L—Flow Cytometry-PR and RPT07C—Confocal and Electron Microscopy-PR).

FUNDING

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Giovanni Wilson Amarante also thanks Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Rede Mineira de Química for financial support.

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Abdel-Aty AS. Pesticidal effects of some imidazolidine and oxazolone derivatives. *World J Agric Sci* 2009;5:105–13.
- Ávila EP, de Mello AC, Diniz R et al. Brønsted acid catalyzed highly diastereoselective Michael-type of azlactones to enones. *Eur J Org Chem* 2013;10:1881–3.
- Ávila EP, Justo RMS, Gonçalves VP et al. Chiral Brønsted acid-catalyzed stereoselective Mannich-type reaction of azlactones with aldimines. *J Org Chem* 2015;80:590–4.
- Azeredo CMO, Santos TG, Noronha Sales Maia BHL et al. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complement Alternat Med* 2014;14:309.
- Bala S, Saini M, Kamboj S. Methods for synthesis of oxazolones, a review. *Int J Chem Tech Res CODEN* 2011;3:1102–18.
- Bala S, Saini M, Kamboj S et al. Synthesis of 2-[4-(substituted benzylidene)-5-Oxo-4,5-dihydro-oxazol-2-ylmethyl]-isoindole-1,3-dione derivatives as novel potential antimicrobial agents. *Iran J Pharm Therapeutics* 2012;11:45–52.
- Barbosa LCA, Teixeira RR, Amarante GW. Synthetic strategies for the preparation of butenolides and their transformation into other derivatives. *Cur Org Synth* 2015;12:746–71.
- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop* 2016;156:1–16.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964;6:93–100.
- Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem I Oswaldo Cruz* 2009;104:549–54.
- Desai NC, Bhavsar AM, Baldaniya BB. Synthesis and antimicrobial activity of 5-imidazolinone. *Indian J Pharm Sci* 2009;71:90–4.
- Di Paola D, Rampakakis E, Chan MK et al. Increased origin activity in transformed versus normal cells: identification of novel protein players involved in DNA replication and cellular transformation. *Nucleic Acids Res* 2010;38:2314–31.
- Garcia FP, Lazarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T et al. Eupomatenoid-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, Article ID 940531. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/940531>.
- Han X, Cui C, Gu Q et al. ZHD-0501, a novel naturally occurring staurosporine analog from *Actinomadura* sp. 007. *Tetrahedron Lett* 2005;46:6137–40.
- Jat RL, Mishra R, Pathak D. Synthesis and anticancer activity of 4-benzylidene-2-phenyloxazol-5-(4h)-one derivatives. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012;4:378–80.
- Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, MacLeod ET et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasite Vector* 2010;3:104.

- Kessler RL, Soares MJ, Probst CM et al. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One* 2013;**8**:e55497.
- Khan URM, Khan MTH, Zia-Ullah SP et al. Oxazolones: new tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem* 2006;**14**: 6027–33.
- Medeiros MGF, Silva AC, Citó AMGL et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int* 2011;**60**:237–41.
- Menna-Barreto RFS, Castro SL. The double-edged sword in pathogenic Trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed Res Int* 2014, Article 614014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/614014>.
- Mukerjee AK. Azlactones: retrospect and prospect. *Heterocycles* 1987;**26**:1077–97.
- Pereira AA, de Castro PP, de Mello AC et al. Brønsted acid catalyzed azlactone ring opening by nucleophiles. *Tetrahedron* 2014;**70**:3271–5.
- Pinheiro DLJ, Batista GMF, Gonçalves JR et al. Sugar-based organocatalyst for the diastereoselective desymmetrization of dibenzylideneacetones. *Eur J Org Chem* 2016;**3**: 459–62.
- Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol* 2013;**11**: 58–66.
- Siddiqui SA, Bhusare SR, Jarikote DV et al. New novel synthesis and antibacterial activity of 1-(Substituted phenyl)-2-phenyl-4-(3'-halo, 4'-hydroxy 5'-methoxy benzylidene)-imidazole-5-ones. *Bull Korean Chem Soc* 2001;**22**:1033–6.
- Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology* 2007;**134**:1649–56.
- Sharma N, Banerjee J, Shrestha N et al. A review on oxazolone, its method of synthesis and biological activity. *Eur J Biomed Pharm Sci* 2015;**2**:964–87.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010;**115**:14–21.
- Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* 2010;**115**:55–68.
- WHO (World Health Organization). Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet n° 340, 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (14 July 2016, date last accessed).
- Witvrouw M, Pannecouque C, Clercq ED et al. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type (HIV-1) replication by some diversely functionalized spirocyclopropyl derivatives. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 1999;**352**:163–6.

ANEXO 3: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS DE EXPRESSÃO ENTRE EPIMASTIGOTAS RESISTENTES A 15 µM DE GIB-24 E CONTROLE (SELVAGEM).

	Intensidade LFQ Média (Log2) Controle	DP Controle	Intensidade LFQ Média (Log2) GIB-24	DP GIB	Significancia Teste T de Student	Peptídeos Unicos	Peso molecular [kDa]	Média GIB- Média CTRL (Log2)	Fold Change	Fasta headers
1	23,37079	0,289067	24,61551	0,162031	+	3	18925	1,244720459	2,369726	Tc00.1047053410243.10
2	30,2256	0,119782	29,5174	0,059463	+	12	2239	-0,708194733	0,612086	Tc00.1047053507259.10; Tc00.1047053487507.10
3	28,18076	0,044924	27,23663	0,249028	+	1	40391	-0,944126129	0,519744	Tc00.1047053504191.10; Tc00.1047053510185.10
4	22,32924	0,162967	23,26396	0,017997	+	5	41175	0,934713364	1,911511	Tc00.1047053504079.6; Tc00.1047053508717
5	22,8326	0,360635	24,03805	0,109686	+	7	67665	1,205451965	2,306095	Tc00.1047053508797.29
6	23,7071	0,182634	24,88199	0,034807	+	4	46461	1,174886703	2,257751	Tc00.1047053418221.30
7	25,25234	0,027233	23,79703	0,070116	+	4	258	-1,455308914	0,364677	Tc00.1047053504933.10
8	25,55586	0,088922	27,13545	0,123646	+	7	44878	1,579582214	2,988833	Tc00.1047053503679.10
9	27,9544	0,186444	27,33261	0,022693	+	10	43494	-0,62178421	0,649867	Tc00.1047053506945.160
10	29,98112	0,137749	29,10352	0,20402	+	3	2964	-0,877599716	0,544272	Tc00.1047053509141.40; Tc00.1047053509129.10
11	25,83625	0,086376	25,38655	0,000722	+	7	38115	-0,449701309	0,732194	Tc00.1047053508541.230; Tc00.1047053507541.40
12	25,41834	0,143661	24,55996	0,055303	+	1	1053	-0,858381271	0,551571	Tc00.1047053511121.11
13	23,42222	0,111663	22,81629	0,157787	+	4	48342	-0,605928421	0,657048	Tc00.1047053511319.10; Tc00.1047053510055.60
14	24,70108	0,034408	24,01863	0,200579	+	7	10893	-0,682449341	0,623106	Tc00.1047053503413.4; Tc00.1047053503975.100

15	27,02741	0,236842	27,79963	0,011703	+	3	15904	0,772212982	1,707888	Tc00.1047053511253.31; Tc00.1047053508867
16	26,99913	0,064862	27,79327	0,232473	+	13	74605	0,794132233	1,734034	Tc00.1047053508231.190; Tc00.1047053506249.70
17	23,97791	0,090425	24,37748	0,039876	+	3	62725	0,39957428	1,319119	Tc00.1047053507073.40
18	21,37668	0,169152	23,04189	0,386913	+	3	21245	1,665210724	3,1716	Tc00.1047053509791.120
19	25,0113	0,048681	25,50654	0,147321	+	8	57843	0,495235443	1,409551	Tc00.1047053507897.30
20	21,51417	0,170852	22,62751	0,290117	+	4	48785	1,1133461	2,163468	Tc00.1047053508649.20; Tc00.1047053509499.38
21	22,47059	0,05809	22,97928	0,005206	+	3	19485	0,508687973	1,422756	Tc00.1047053508711.10
22	23,68401	0,728558	26,29298	0,346072	+	1	12422	2,608966827	6,100666	Tc00.1047053503893.100; Tc00.1047053508507.40
23	27,36456	0,017592	27,21492	0,029271	+	4	378	-0,149633408	0,90148	Tc00.1047053506301.11
24	22,0958	0,160198	22,68563	0,017178	+	8	20172	0,589834213	1,505074	Tc00.1047053511381.40
25	25,3205	0,336134	27,04148	0,113157	+	1	19809	1,720975876	3,296593	Tc00.1047053504069.70
26	25,46896	0,069397	25,73887	0,03239	+	10	53476	0,269906998	1,20573	Tc00.1047053506359.60
27	20,73093	0,045072	20,9518	0,043351	+	3	85371	0,220870972	1,165437	Tc00.1047053508443.30; Tc00.1047053509157.90
28	20,57611	0,071248	21,73075	0,21607	+	2	54575	1,154630661	2,226273	Tc00.1047053504163.70; Tc00.1047053510301.40
29	22,80135	0,008485	23,75222	0,041512	+	2	43898	0,950866699	1,933034	Tc00.1047053511523.60; Tc00.1047053511733.50
30	24,72458	0,369558	26,06092	0,220247	+	11	62273	1,336338043	2,525096	Tc00.1047053509859.40
31	25,92506	0,049071	26,13712	0,021992	+	6	1682	0,212057114	1,158339	Tc00.1047053508533.40
32	30,82772	0,064011	29,77997	0,013745	+	23	45056	-1,047748566	0,483722	Tc00.1047053508111.30; Tc00.1047053507875.20
33	26,974	0,112156	27,34737	0,029093	+	14	50094	0,373371124	1,295376	Tc00.1047053505989.82; Tc00.1047053508693.80

34	26,91003	0,011082	26,45809	0,124237	+	7	27915	-0,451938629	0,73106	Tc00.1047053508823.70
35	26,86087	0,067199	25,86155	0,161149	+	1	11308	-0,999320984	0,500235	Tc00.1047053507881.20
36	24,47079	0,153768	23,40134	0,128087	+	4	79421	-1,069440842	0,476504	Tc00.1047053508153.994
37	24,16116	0,161064	23,29373	0,157674	+	2	32982	-0,867424011	0,548125	Tc00.1047053511837.60
38	24,5279	0,057642	24,12817	0,030265	+	5	95011	-0,399723053	0,758004	Tc00.1047053511321.10
39	25,7472	0,01199	25,29549	0,06608	+	5	34085	-0,451705933	0,731178	Tc00.1047053511293.69
40	24,14495	0,089993	24,61861	0,06925	+	7	88452	0,473659515	1,388627	Tc00.1047053511249.60
41	25,02198	0,001168	25,55034	0,065613	+	8	46257	0,528362274	1,442291	Tc00.1047053508699.40
42	26,49838	0,03794	25,33989	0,227964	+	5	1649	-1,158485413	0,447983	Tc00.1047053507715.34; Tc00.1047053511115.30
43	25,48433	0,202846	24,67043	0,158163	+	2	67899	-0,813896179	0,568844	Tc00.1047053506405.120
44	25,1591	0,333474	23,73915	0,308388	+	4	6505	-1,419940948	0,373728	Tc00.1047053508257.70
45	24,04677	0,026784	24,92155	0,11765	+	3	73223	0,874786377	1,833737	Tc00.1047053506175.20; Tc00.1047053509669.70
46	22,52038	0,085049	23,86111	0,076037	+	6	12886	1,340736389	2,532806	Tc00.1047053504425.70; Tc00.1047053509331.200
47	24,70511	0,013204	24,12446	0,085764	+	4	19096	-0,580652237	0,668661	Tc00.1047053506177.100; Tc00.1047053506181.104
48	23,43805	0,134997	23,93622	0,063861	+	7	37718	0,498170853	1,412422	Tc00.1047053507649.10; Tc00.1047053510861.30
49	26,5467	0,030969	26,92961	0,016281	+	1	1542	0,382904053	1,303964	Tc00.1047053507709.120
50	25,62671	0,053847	25,29867	0,00482	+	10	14997	-0,328039169	0,796618	Tc00.1047053509671.10
51	23,32629	0,002425	23,76038	0,088133	+	4	99005	0,434087753	1,351056	Tc00.1047053511261.120
52	25,08663	0,154657	23,84239	0,12472	+	2	14036	-1,244245529	0,422129	Tc00.1047053506753.130

53	26,32304	0,085619	25,78216	0,114111	+	3	23032	-0,540882111	0,687351	Tc00.1047053509791.189
54	23,45174	0,29272	24,60521	0,124395	+	7	60504	1,1534729	2,224487	Tc00.1047053511181.20
55	26,78338	0,04654	27,1163	0,053356	+	8	44973	0,332920074	1,25956	Tc00.1047053506629.220
56	22,68711	0,261634	24,06771	0,114233	+	3	45202	1,380607605	2,60378	Tc00.1047053506577.70 ; Tc00.1047053507709.70
57	23,59943	0,061553	23,09612	0,048177	+	2	30008	-0,503307343	0,705488	Tc00.1047053511391.160
58	20,22752	0,193154	21,92559	0,168114	+	3	52448	1,698074341	3,244676	Tc00.1047053507011.130
59	22,4896	0,041451	23,43385	0,016024	+	5	51302	0,944253922	1,924194	Tc00.1047053510661.70
60	23,43694	0,039344	22,92389	0,036612	+	3	56764	-0,513050079	0,700739	Tc00.1047053510661.60
61	22,50703	0,125951	22,07063	0,021166	+	3	70436	-0,436401367	0,738976	Tc00.1047053511217.160; Tc00.1047053506573.60
62	23,48432	0,234285	24,95031	0,251482	+	3	17889	1,465990067	2,76253	Tc00.1047053506859.90; Tc00.1047053511815.60
63	22,59885	0,313211	23,71477	0,140083	+	1	36784	1,115919113	2,16733	Tc00.1047053511751.160
64	27,79707	0,010192	27,51053	0,017499	+	19	59185	-0,28653717	0,819868	Tc00.1047053511725.250
65	24,49106	0,059348	24,13552	0,044832	+	5	18746	-0,355545044	0,781574	Tc00.1047053508409.60
66	22,58903	0,041162	23,19775	0,167472	+	5	75665	0,608720779	1,524906	Tc00.1047053506195.250; Tc00.1047053503959.30
67	23,64143	0,181566	24,27814	0,04703	+	3	12198	0,636714935	1,554785	Tc00.1047053510719.240; Tc00.1047053405737.14
68	26,92327	0,089908	26,49021	0,102886	+	8	39636	-0,433063507	0,740687	Tc00.1047053510431.250
69	29,2468	0,275212	27,95331	0,050042	+	11	41759	-1,293491364	0,407963	Tc00.1047053511277.60; Tc00.1047053506357.50
70	27,55479	0,02468	27,88239	0,00066	+	12	53548	0,327590942	1,254916	Tc00.1047053507611.370

71	28,60479	0,155385	27,04823	0,245949	+	13	42107	-1,556560516	0,339961	Tc00.1047053506559.410
----	----------	----------	----------	----------	---	----	-------	--------------	----------	------------------------

ANEXO 4: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS EPIMASTIGOTAS RESISTENTES A 15 µM DE GIB-24 QUE NÃO ESTÃO PRESENTES NO CONTROLE (SELVAGEM).

	Intensidade LFQ Controle #1	Intensidade LFQ Controle #2	Intensidade LFQ GIB-24 #1	Intensidade LFQ GIB-24 #1	Peptídeos Únicos	Identificação (<i>Fasta headers</i>)	Função/ Domínios identificados
1	NaN	NaN	24,2819	24,7577	3	Tc00.1047053507031.64;	Hipotética, conservada; Sem identificação de domínios
2	NaN	NaN	24,0351	24,9791	2	Tc00.1047053504069.34	Hipotética, conservada; Domínio BolA
3	NaN	NaN	23,723	24,414	2	Tc00.1047053511245.150; Tc00.1047053506661.10	Elongase de ácido graxo, putativa; Domínio GNS1/SUR4
4	NaN	NaN	25,7276	24,5966	2	Tc00.1047053506753.170	Biossíntese de ubiquinona (-like), putativa; Domínio Coq4
5	NaN	NaN	24,8186	25,3594	2	Tc00.1047053511725.174	Pequena ribonucleoproteína nuclear Sm-G, putativa; Domínio LSM

ANEXO 5: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS EPIMASTIGOTAS CONTROLE (SELVAGEM) QUE NÃO ESTÃO PRESENTES NOS EPIMASTIGOTAS RESISTENTES A 15 µM DE GIB-24.

	Intensidade LFQ Controle #1	Intensidade LFQ Controle #2	Intensidade LFQ GIB-24 #1	Intensidade LFQ GIB-24 #1	Peptídeos Únicos	Identificação (Fasta headers)	Função/ Domínios identificados
1	24,7188	24,0576	NaN	NaN	2	Tc00.1047053503641.19	Peroxina 12, putativo; Região amino terminal Pex12/Pex12
2	26,7445	26,0254	NaN	NaN	3	Tc00.1047053508989.9	Nucleosídeo fosforilase, putativo; PNP_UDP_1 Superfamília de fosforilase
3	26,5934	25,6914	NaN	NaN	3	Tc00.1047053510861.140	Serina / treonina proteína quinase, putativo; Domínio proteína-quinase
4	24,3005	24,5963	NaN	NaN	4	Tc00.1047053511807.200	Hipotética, conservada; Sem identificação de domínios
5	27,9707	24,1193	NaN	NaN	3	Tc00.1047053506559.240; Tc00.1047053508131.19	Hipotética, conservada; Domínio família das Glicosídeo hidrolase 65