

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARAMÍS JOSÉ PEREIRA

AVALIAÇÃO DOS PERFIS LIPÍDICOS DOS PARASITOS *Trypanosoma cruzi* E  
*Angomonas deanei*

CURITIBA

2013

ARAMÍS JOSÉ PEREIRA

AVALIAÇÃO DOS PERFIS LIPÍDICOS DOS PARASITOS *Trypanosoma cruzi* E  
*Angomonas deanei*.

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme  
Lanzi Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderson  
Duarte da Rocha

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Pereira, Aramis José

Avaliação dos perfis lipídicos dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e  
*Angomonas deanei*. / Aramis José Pereira – Curitiba, 2013.  
79f.: il. ; 30cm.

Orientador: Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Lipídeos. 2. *Trypanosoma cruzi*. I. Título II. Sasaki, Guilherme  
Lanzi. III. Rocha, Wanderson Duarte da. IV. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica.


CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

ARAMÍS JOSÉ PEREIRA

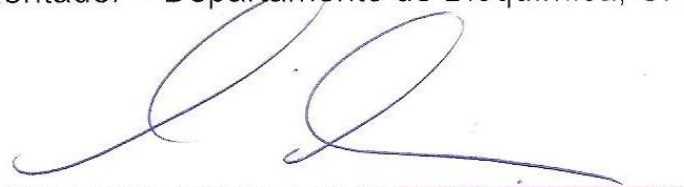
AVALIAÇÃO DOS PERFIS LIPÍDICOS DOS PARASITOS *Trypanosoma cruzi* E  
*Angomonas deanei*

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Orientador – Departamento de Bioquímica, UFPR.



Prof. Dr. Andersson Barison

Departamento de Química, UFPR.



Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

Departamento de Bioquímica, UFPR.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus por sua criação. À minha família e amigos pelo incentivo e apoio durante o caminho.

Aos meus orientadores Guilherme Lanzi Sasaki e Wanderson Duarte da Rocha por toda ajuda, direcionamento e incentivo que me deram. Ao Arquimedes pela colaboração indispensável e constante nos trabalhos e pela companhia. Aos colegas, em especial, do laboratório de Química de Carboidratos e Genômica Funcional de Parasitos pela companhia e colaboração em inúmeros momentos; a ajuda de cada um de vocês foi muito importante: Larry, Nessana, Yanna, Popó, Lauro, Mônica, Normanda, Letícia, Vassoler, Fhernanda, Ana Helena, Fernanda, Elaine, Adamara, Camila, Geórgia, Thaísa, Juliane, Kassandra, Simone, Daniel, Andrea, Carol, Rosane, Tatiane, Irene, Prof. Thales, Prof. Marcello e Prof. Lucimara.

À minha turma de mestrado pelos momentos compartilhados.

À Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade dada.

Aos professores Andersson Barison e Marcelo Müller dos Santos por terem aceitado o convite para serem a banca examinadora deste trabalho.

Aos órgãos financiadores (CAPES/Reuni, CNPq e Fundação Araucária) pela bolsa de mestrado.

*“Em verdade, em verdade vos digo: se o grão de trigo, caído na terra, não morrer, fica só; se morrer produz muito fruto. Quem ama a sua vida, perdê-la-á; mas quem odeia a sua vida neste mundo, conservá-la-á para a vida eterna.”*

Evangelho segundo São João, cap. 12, v. 23-24.

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi* é um parasito patogênico em mamíferos, causador da doença de Chagas em humanos, cujo tratamento atual não é eficiente e possui efeitos colaterais diversos, o que impulsiona a busca de novos fármacos. Dentre eles destaca-se a classe dos inibidores da biossíntese de ergosterol que em breve poderão ser utilizados clinicamente. *Angomonas deanei* é um tripanossomatídeo parasito de insetos que possui um endossimbionte bacteriano. Pelo fato de ser avirulento para humanos e possuir uma baixa exigência nutricional de cultivo, *A. deanei* se constitui um excelente modelo para estudos em tripanossomatídeos. Os lipídios desempenham papéis importantes na célula (como estrutural, energético e regulatório) e recentemente um campo de estudos chamado lipidômica tem despertado o interesse de diversos pesquisadores. A lipidômica trata da caracterização e quantificação de todos os lipídios presentes na célula ou tecido de interesse e do relacionamento destes com outros componentes, como enzimas e demais proteínas. Neste trabalho foi realizado um estudo lipidômico comparativo entre cepas de *T. cruzi*; avaliou-se os efeitos de um inibidor da biossíntese de ergosterol no perfil lipídico de *T. cruzi*; comparamos a composição lipídica de *T. cruzi* e *A. deanei* e entre *A. deanei* crescida na ausência e presença de soro fetal bovino e sem o endossimbionte. Através de técnicas de ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e análise por componentes principais, identificamos como principais diferenças entre as cepas de *T. cruzi*: ácido graxo C18:1, fosfatidilserina e colesterol. Os componentes afetados pelo tratamento com cetoconazol foram ergosterol, eburicol, colesterol, colesterol acetato, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, succinato e cistina. A análise entre *T. cruzi* e *A. deanei* revelou fosfatidilserina, ácidos graxos poliinsaturados (C18:2 e C18:3), C17:0 e um ácido graxo ciclopropano C19 como os componentes principais na diferenciação, ao passo que entre *A. deanei* sem SFB, com SFB e curada tivemos ergosterol, fosfatidilserina e ácidos graxos insaturados. Deste modo, a união das técnicas analíticas usadas neste trabalho permitiu um estudo lipidômico que foi capaz de identificar a maioria dos componentes encontrados e avaliar as principais diferenças entre os parasitos e suas condições de crescimento testadas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. *Angomonas deanei*. Lipidômica.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is a pathogen in mammals and etiological agent of Chagas disease in humans, which treatment is not efficient and have a lot of side effects, stimulating the new drugs research. The inhibitors of ergosterol biosynthesis soon can be used clinically for treatment of this disease. *Angomonas deanei* is a trypanosomatid parasite of insects that has an endosymbiont. Since it is avirulent for humans and has low nutritional requirements, *A. deanei* has become an excellent model of study in trypanosomatids. Lipids play important roles in cells (as structural, energetic and regulatory) and recently a new research field called lipidomics has attracted the concern of many researchers. Lipidomics is the characterization and quantification of all lipid classes present on cells or tissue of interest and their relationship with other components, like enzymes and proteins. We carried out a comparative lipidomic study among *T. cruzi* strains; also we evaluated the effects of an ergosterol biosynthesis inhibitor (ketoconazole) in lipid profile of *T. cruzi*; we compare the lipid composition of *T. cruzi* and *A. deanei* and among *A. deanei* grown in absence and presence of fetal calf serum (FCS) and without endosymbiont (cured). Through nuclear magnetic resonance, gas chromatography coupled to mass spectrometry and principal component analysis, we identified as main differences among *T. cruzi* strains: C18:1 fatty acid, phosphatidylserine and cholesterol. The components affected by ketoconazole treatment were ergosterol, eburicol, cholesterol, cholesterol acetate, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, succinate and cystine. The comparison of *T. cruzi* and *A. deanei* revealed that phosphatidylserine, polyunsaturated fatty acids (C18:2 and C18:3), C17:0 and a C19 cyclopropane fatty acid are the most variable components. Meanwhile, when we compared the influence of *A. deanei* growth conditions (with or without FCS), and the absence of the endosymbiont the ergosterol, phosphatidylserine and unsaturated fatty acids were the most affected components. Thereby, the union of analytical techniques used in this work allowed a lipidomic study that was able to identify most of components and evaluate the main differences among parasites and their grown conditions tested.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. *Angomonas deanei*. Lipidomics.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1 -  | CICLO DE VIDA DE <i>T. cruzi</i> .....  | 17 |
| FIGURA 2 -  | ESTRUTURAS QUÍMICAS DO BENZONIDAZOL E NIFURTIMOX.....   | 19 |
| FIGURA 3 -  | MICROSCOPIA DE <i>A. deanei</i> .....   | 20 |
| FIGURA 4 -  | OS PRINCIPAIS LIPÍDIOS E SEUS COMPARTIMENTOS CELULARES.....   | 22 |
| FIGURA 5 -  | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SECCÇÃO LONGITUDINAL DA FORMA EPIMASTIGOTA DE <i>T. cruzi</i> .....                            | 25 |
| FIGURA 6 -  | ESTRUTURAS QUÍMICAS DO COLESTEROL, ESTIGMASTEROL E ERGOSTEROL.....  | 27 |
| FIGURA 7 -  | VIA DE BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL EM <i>T. cruzi</i> .....  | 29 |
| FIGURA 8 -  | ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS AZÓIS USADOS COMO ANTIFÚNGICOS.....   | 31 |
| FIGURA 9 -  | VIA DE BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL EM <i>T. cruzi</i> : PRODUTOS, ENZIMAS E INIBIDORES.....                                    | 32 |
| FIGURA 10 - | EFEITO INIBITÓRIO DE CETOCONAZOL NA TAXA DE CRESCIMENTO DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> .....                           | 42 |
| FIGURA 11 - | ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE <i>T. cruzi</i> E <i>A. deanei</i> .....                       | 44 |
| FIGURA 12 - | MAPA PARCIAL DE CORRELAÇÃO DIRETA <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C OBTIDO DE EXPERIMENTO DE HSQC-ed DE <i>T. cruzi</i> ..... | 46 |
| FIGURA 13 - | ACP FEITA DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> .....                  | 47 |
| FIGURA 14 - | ACP FEITA DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE <i>A. deanei</i> .....                           | 49 |
| FIGURA 15 - | ACP A PARTIR DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DO CLONE DM28c DE <i>T. cruzi</i> CONTROLE E TRATADO.....      | 53 |
| FIGURA 16 - | GRÁFICO DE COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DE ESTERÓIS DO CLONE DM28c DE <i>T. cruzi</i> E <i>A. deanei</i> .....                     | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 - ASSINALAMENTOS LIPÍDICOS DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ OBTIDOS A PARTIR DE HSQC-ed DO EXTRATO LIPÍDICO DO CLONE DM28c DE <i>T. cruzi</i> CONTROLE E TRATADO COM CETOCONAZOL..... | 50 |
| TABELA 2 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS, ÍNDICE DE DUPLA LIGAÇÃO E RAZÃO DE UFA/SFA DE <i>A. deanei</i> E <i>T. cruzi</i> .....                                      | 55 |
| TABELA 3 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DE ESTERÓIS DO CLONE DM28c DE <i>T. cruzi</i> E <i>A. deanei</i> .....   | 56 |

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| $\delta$                            | - Deslocamento químico                                       |
| ACP                                 | - Análise por componentes principais                         |
| Ala                                 | - Alanina  |
| BSTFA                               | - N,N-bis(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida            |
| $^{13}\text{C}$                     | - Núcleo de carbono treze                                    |
| Cer- $\text{C}_n$                   | - Carbono do resíduo de esfingosina de ceramida              |
| CG-EM                               | - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas   |
| ChA-C6                              | - Carbono 6 de colesterol acetato                            |
| Chol- $\text{C}_n$                  | - Carbono de colesterol                                      |
| Col17G2                             | - Clone da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>                |
| Cys- $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ | - Carbono alfa ou beta de cistina                            |
| DAG                                 | - Diacilglicerol   |
| Erg- $\text{C}_n$                   | - Carbono de ergosterol                                      |
| F $\alpha$                          | - Hidrogênio/carbono alfa de ácidos graxos                   |
| F $\beta$                           | - Hidrogênio/carbono beta de ácidos graxos                   |
| GIPLs                               | - Glicoinositolfosfolipídios                                 |
| Gly- $\text{C}_n$                   | - Carbono do resíduo de glicerol                             |
| GPIs                                | - Glicosilfosfatidilinositóis                                |
| $^1\text{H}$                        | - Núcleo de hidrogênio                                       |
| HSQC                                | - <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>              |
| Hz                                  | - Hertz  |
| IL-12                               | - Interleucina 12  |
| LIT                                 | - <i>Liver infusion tryptose</i>                             |
| MeOH                                | - Metanol  |
| MeOD                                | - Metanol deuterado  |
| Mono-UFA                            | - Ácidos graxos monoinsaturado                               |
| PBS                                 | - Tampão fosfato salino                                      |
| PC-1'/2'                            | - Carbono 1' e 2' do grupo cabeça colina de fosfatidilcolina |
| PC1                                 | - Primeiro componente principal                              |

|               |  |
|---------------|--|
| PC2           | - Segundo componente principal   |
| PE-1'/2'      | - Carbono 1' e 2' do grupo cabeça etanolamina de fosfatidiletanolamina |
| PI-n'         | - Carbono de grupo cabeça inositol de fosfatidilinositol               |
| PLA           | - Plasmalógeno   |
| Poly-UFA      | - Ácidos graxos poliinsaturados  |
| PS-1'         | - Carbono 1' de grupo cabeça serina de fosfatidilserina                |
| RMN           | - Ressonância magnética nuclear  |
| SFB           | - Soro fetal bovino  |
| SM            | - Esfingomielina   |
| Suc           | - Succinato  |
| TAG           | - Triacilglicerol  |
| TMS           | - Tetrametilsilano   |
| TNF- $\alpha$ | - Fator de necrose tumoral alfa  |
| UTD           | - Unidade de tipagem distinta  |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 16 |
| 2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> E DOENÇA DE CHAGAS .....  | 16 |
| 2.2 <i>Angomonas deanei</i> .....  | 19 |
| 2.3 LIPÍDIOS .....   | 20 |
| 2.3.1 Lipídios e sua importância .....   | 20 |
| 2.3.2 Lipidômica .....   | 22 |
| 2.3.3 Lipídios e <i>T. cruzi</i> .....   | 24 |
| 2.3.3.1 Esteróis e <i>T. cruzi</i> .....   | 27 |
| 2.3.3.1.1 Inibição da biossíntese de ergosterol .....  | 28 |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....   | 34 |
| <b>4 OBJETIVOS</b> .....   | 35 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL .....   | 35 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 35 |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 36 |
| 5.1 CULTIVO DOS PARASITOS, ENSAIO DE INIBIÇÃO E CURVA DE<br>INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO .....  | 36 |
| 5.2 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS .....  | 37 |
| 5.3 DERIVATIZAÇÃO PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA<br>ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) .....  | 38 |
| 5.4 ANÁLISES DE CG-EM .....  | 38 |
| 5.5 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA<br>NUCLEAR (RMN) .....  | 39 |
| 5.5.1 Redução dos dados e Análise por Componentes Principais (ACP) .....   | 40 |
| <b>6 RESULTADOS</b> .....  | 41 |
| 6.1 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE FORMAS<br>EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> NA PRESENÇA DE CETOCONAZOL .....   | 41 |
| 6.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE <i>T. cruzi</i> E <i>A. deanei</i> POR<br>RMN DE <sup>1</sup> H E CORRELAÇÃO DIRETA <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C ..... | 41 |
| 6.3 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) .....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 6.4 ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E ESTERÓIS POR<br>CG-EM. .... | 54 |
| <b>7 DISCUSSÃO</b> .....  | 57 |
| <b>8 CONCLUSÃO</b> .....  | 63 |
| <b>9 PERSPECTIVAS</b> .....   | 65 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 66 |

## 1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, a qual é endêmica em vários países da América Latina onde se estima que existam 7,7 a 10 milhões de pessoas infectadas. Ainda não há um tratamento totalmente eficaz para esta doença, existindo medicamentos que não possuem efeitos em todas as fases da doença e também com muitos efeitos colaterais. O desenvolvimento de pesquisas para identificar possíveis alvos de drogas mais eficazes tem despertado interesse de vários grupos de pesquisa. Dentre as classes de fármacos, alguns azóis (inibidores da biossíntese de ergosterol) têm-se destacado como um grupo potencial para ser utilizado no tratamento da doença, principalmente posaconazol e ravuconazol.

*Angomonas deanei* é um protozoário parasito de insetos. Também pertencente à família Trypanosomatidae, possui um endossimbionte bacteriano, sendo um parasita muito usado como modelo para estudos nutricionais de protozoários.

Os lipídios estão presentes principalmente nas membranas celulares dos parasitos, as quais exercem função estrutural, bem como atuam em processos específicos como invasão da célula hospedeira, aquisição de nutrientes e proteção contra o sistema imunológico. Variações na composição de lipídios na membrana celular de um organismo podem ser responsáveis por alterar a fluidez de membrana e também afetar a eficiência de fagocitose e a permeabilidade a drogas, alterando assim a patogenicidade do microrganismo. O conhecimento da composição lipídica de diferentes cepas de *T. cruzi* pode fornecer importantes dados na identificação de novos alvos químicos para tratamento, além de um melhor conhecimento de seu metabolismo.

A lipidômica é um campo recente e que tem-se mostrado bastante útil ao tratar da identificação e quantificação dos lipídios, envolvendo também um estudo dos demais componentes envolvidos em seu metabolismo e regulação.

Utilizando-se de técnicas avançadas de análise estrutural de lipídios (como ressonância magnética nuclear, cromatografia e espectrometria de massas) pode-se traçar o perfil lipidômico destes parasitos e obter informações

detalhadas sobre seu estado metabólico e estrutural, permitindo inferir conclusões e direcionar estudos mais específicos.

Um estudo lipidômico a respeito de *T. cruzi* pode colaborar assim na identificação de potenciais alvos de drogas e também fornecer um conhecimento sobre as alterações sofridas pelo parasito quando submetido a um tratamento. A composição lipídica de diferentes cepas também pode ajudar a explicar comportamentos diferentes observados entre elas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, é o agente etiológico da doença de Chagas ou também chamada de tripanossomíase Americana. A doença de Chagas é endêmica em vários países da América Latina e de acordo com estimativas da Organização Pan Americana de Saúde (SALVATELLA, 2006) e da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) 7,7 a 10 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com *T. cruzi* e 10 a 14 mil mortes por ano são causadas pela doença de Chagas.

Este protozoário pode ser transmitido por várias espécies de insetos hematófagos da subfamília *Triatominae* e muitas espécies de mamíferos silvestres funcionam como seu reservatório. Este parasita possui seu ciclo biológico em hospedeiros vertebrados e invertebrados apresentando diferentes formas evolutivas em cada um deles (Figura 1). Nos vertebrados são encontrados nos tecidos intracelularmente as formas amastigotas (replicativa e infectiva), e extracelularmente as tripomastigotas sanguíneas (não-replicativa e infectiva). Já no hospedeiro invertebrado, encontram-se formas epimastigotas (replicativa e não infectiva) e tripomastigota metacíclica (não-replicativa e infectiva) (BRENER, ANDRADE e BARRAL-NETO, 2000; NEVES, DE MELO e LINARDI, 2005).

Em laboratório, as formas epimastigotas são cultivadas em meio de cultura acelular (meio LIT, *liver infusion tryptose*). Por outro lado, as formas infectivas amastigotas e tripomastigotas podem ser obtidas a partir de cultivos em monocamadas (infecção de fibroblastos) ou por meio da metaciclogênese e amastigogênese em meio axênico (BRENER, ANDRADE e BARRAL-NETO, 2000).



Figura 1 – CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de DPD/CDC: <http://dpx.cdc.gov/dpx/html/trypanosomiasisamerican.htm>

A doença de chagas pode ser assintomática, aguda ou crônica, sendo um dos sinais mais precoces o desenvolvimento de uma área eritematosa e endurecida denominada chagoma no local da picada. Esta doença torna-se grave em crianças abaixo de 5 anos, levando a um processo agudo com envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), febre, calafrios, mal-estar, mialgia e fadiga (MURRAY, 2006). O microrganismo se aloja nos músculos e a invasão dos parasitos resulta em uma variada estratégia de sobrevivência, que impede a maturação do fagossomo, inibe a fusão com os lisossomos e a acidificação ou inversamente promove a invasão pelo recrutamento rápido dos lisossomos (ROITT, BROSTOFF e MALE, 2003). A doença de chagas crônica caracteriza-se por hepatoplenomegalia, miocardite e aumento do esôfago e cólon resultante da destruição das células nervosas e de outros tecidos responsáveis pelo crescimento deste órgão (MURRAY, 2006).

A alta heterogeneidade da população do parasito é um ponto importante, sabendo-se já que, no Brasil, há uma predominância de um grupo

de cepas durante o ciclo selvagem e de outro no ciclo doméstico, porém ainda não foi possível estabelecer uma associação entre seu genótipo e manifestações da doença (MANOEL-CAETANO e SILVA, 2007). Estudos com inúmeras cepas e isolados utilizando vários marcadores moleculares revelaram a existência, inicialmente, de duas linhagens filogeneticamente distintas na população de *T. cruzi* (ANÔNIMO, 1999; ZINGALES *et al.*, 1999). Posteriormente, evidências da existência de outras linhagens foram apresentadas, até que em 2009, com o intuito de unificar as nomenclaturas utilizadas na classificação das cepas de *T. cruzi*, foi proposta a existência de 6 grupos de cepas do parasito (*T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI), classificadas de acordo com sua unidade de tipagem distinta (UTD) (ZINGALES *et al.*, 2009). Estudos indicam diferenças biológicas importantes entre os grupos de cepas de *T. cruzi* inclusive diferenças nos níveis de variabilidade genômica, os quais são significativamente maiores em cepas de *T. cruzi* pertencentes à linhagem *T. cruzi* II (BUSCAGLIA e DI NOIA, 2003). Também são relatadas diferenças de infectividade entre as cepas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 1999; 2002; ANDRADE *et al.*, 2010) e reações distintas no hospedeiro foram observadas quando cobaias foram infectadas com diferentes cepas (RODRIGUES *et al.*, 2010). Uma análise qualitativa e quantitativa abrangente dos compostos presentes nas diferentes cepas colaboraria, neste sentido, a elucidar essas diferenças relatadas entre elas. Cabe ressaltar que a identificação de marcadores moleculares de fácil e rápida utilização pode facilitar os trabalhos de identificação de cepas em laboratório.

Os fármacos mais usados atualmente para o tratamento da doença de Chagas são o nirfutimox (um 5-nitrofurano, [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina)] tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-di-óxido, da Bayer®) e o benzonidazol, (um 2-nitroimidazol, N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, da Roche®), comercializados respectivamente com os nomes de Lampit e Rochagan (Figura 2). Esses dois compostos mostraram alta atividade experimental *in vivo* e *in vitro* contra o *T. cruzi* (COURA e CASTRO, 2002).

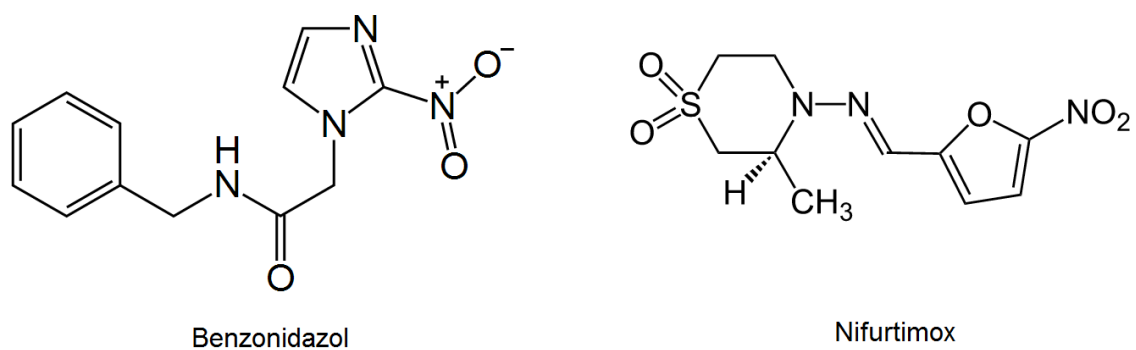


FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO BENZONIDAZOL E NIFURTIMOX.

O nifurtimox atua em nível mitocondrial, através da geração de radicais de  $O_2$  e  $H_2O_2$  por nitroredutases que são compostos reativos capazes de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas. Sendo *T. cruzi* deficiente em mecanismos de detoxificação, torna-se susceptível a tais intermediários. Já o benzonidazol atua por mecanismo diferente, envolvendo a modificação covalente de macromoléculas por intermediários nitroreduzidos, os quais interagem com o DNA do *T. cruzi* resultando em degradação e inibição da biossíntese dessas macromoléculas (COURA e CASTRO, 2002). Estas drogas, porém apresentam inúmeros efeitos colaterais, como perda de peso, alteração psíquica, alteração do sono e manifestações digestivas como náusea, cólicas e diarreia no caso do nifurtimox, ao passo que o uso do benzonidazol acarreta sintomas de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia (CASTRO e DIAZ DE TORANZO, 1988).

Desta forma, as drogas atualmente utilizadas estão longe de serem consideradas ideais, logo o desenvolvimento de pesquisas para identificar alvos de drogas mais eficazes é de grande importância para a saúde pública.

## 2.2 *Angomonas deanei*

Anteriormente denominada *Crithidia deanei* e agora reclassificada, *A. deanei* é um protozoário monogenético, parasito de insetos que tem como

característica diagnóstica a ocorrência de formas coanomastigotas (MOTTA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Pertencente à família Trypanosomatidae, foi isolado do hemíptero *Zelus leucogrammus* e possui um endossimbionte bacteriano pertencente ao gênero *Bordetella* de nome *Kinetoplastibacterium crithidii* (Figura 3). É um gênero muito usado como modelo para estudos em protozoários, possuindo uma baixa exigência nutricional e facilidade em seu cultivo. Possui um mecanismo de transmissão entre dípteros que parece incluir um estágio de vida livre capaz de infectar as larvas dos hospedeiros e um comprimento médio, célula e flagelo, de 4 a 13  $\mu\text{m}$  e 7 a 14  $\mu\text{m}$  respectivamente (NEVES, DE MELO e LINARDI, 2005; MOTTA *et al.*, 2010).

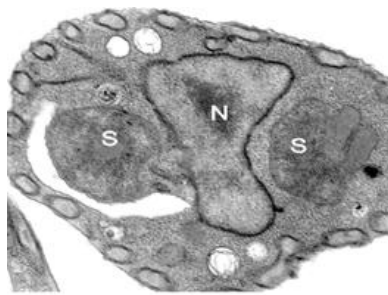


FIGURA 3 – MICROSCOPIA DE *A. deanei* MOSTRANDO O NÚCLEO (N) E O ENDOSSIMBIONTE (S). Adaptado de Motta *et al.* (2010).

## 2.3 LIPÍDIOS

### 2.3.1 Lipídios e sua importância

Os lipídios desempenham uma diversidade de funções na célula e estão integrados bioquimicamente nela permitindo assim o cumprimento de suas funções biológicas específicas (GROSS e HAN, 2011). Segundo estimativas, eles abrangem dezenas de milhares de compostos distintos (VAN MEER, 2005; SHEVCHENKO e SIMONS, 2010).

No nível estrutural são os principais componentes das membranas biológicas. Em um segundo nível, são uma importante fonte de energia celular

através da oxidação de ácidos graxos e triacilgliceróis. Além disso, lipídios são importantes na regulação bioenergética celular, integrando os processos oxidativos metabólicos (MICHALIK *et al.*, 2006), modulando o balanço sistêmico de energia através da produção de eicosanóides e lisolipídios (SKOURA e HLA, 2009; VEGIOPOULOS *et al.*, 2010) e regulando a cadeia de transporte mitocondrial de elétrons em um acoplamento eficiente, função esta exercida pela cardiolipina e ácidos graxos (Figura 4) (ZHANG, MILEYKOVSKAYA e DOWHAN, 2002; BREEN *et al.*, 2006). Em um terceiro nível, as membranas lipídicas servem como suportes moleculares que promovem interações entre porções associadas à membrana que regulam a sinalização celular, a fim de facilitar a transmissão de informações através das membranas celulares e entre os compartimentos intracelulares ou para outras células (GROSS e HAN, 2011). Além disso, a dinâmica molecular e as propriedades físicas das bicamadas lipídicas são determinantes críticos para a atividade de proteínas transmembrana como os canais e bombas iônicas (SCHMIDT e MACKINNON, 2008). Por fim, muitas classes de lipídios servem como mensageiros secundários na transdução de sinal (como eicosanóides, lisolipídios, fosfoinositídeos e endocanabinóides), localizando-se nas membranas biológicas num estado latente, podendo ser ativados por hidrólise (WOLF e GROSS, 1985; SHAW e CANTLEY, 2006).

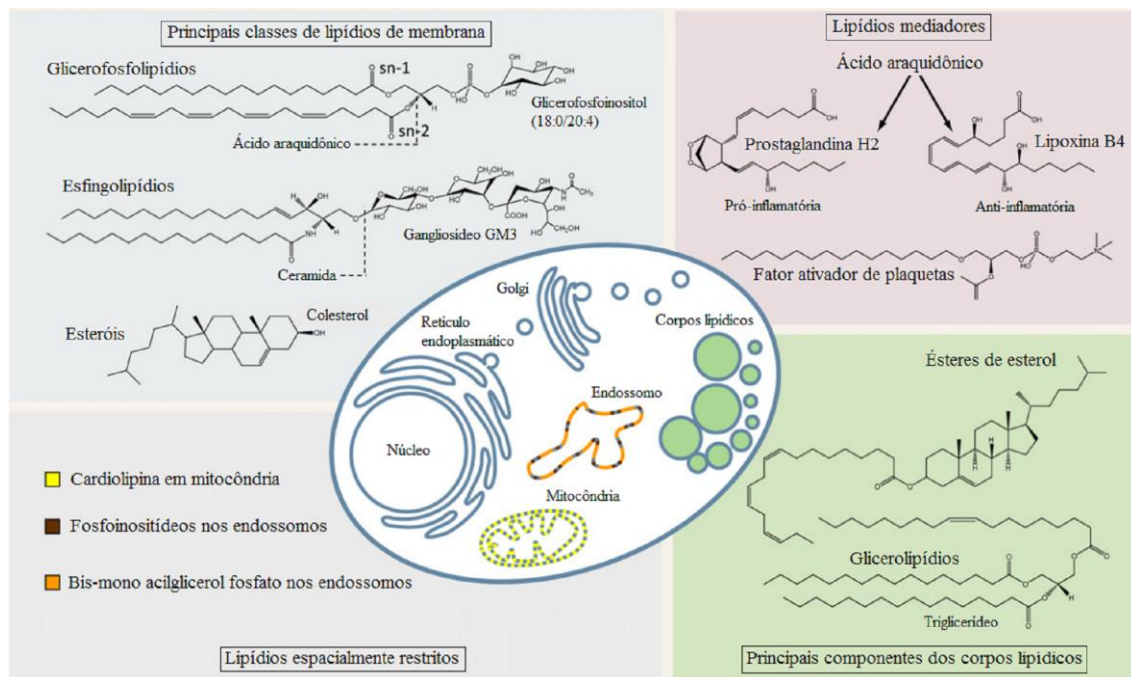


FIGURA 4 – OS PRINCIPAIS LIPÍDIOS E SEUS COMPARTIMENTOS CELULARES. Adaptado de Wenk (2010).

### 2.3.2 Lipidômica

Lipidômica é um novo termo para descrever um campo científico amplo que abrange as enzimas participantes do metabolismo e transportadores de lipídios, seus genes e regulação, além da determinação quantitativa de lipídios no espaço e no tempo (VAN MEER *et al.*, 2007). Lipídios são insolúveis em meio aquoso e naturalmente formam barreiras que separam o meio extra e intracelular, podendo-se definir a lipidômica também como um campo especializado da metabolômica, usando por sua vez solventes hidrofóbicos para extrair seus componentes de interesse localizados principalmente nas membranas biológicas (LAYRE e MOODY, 2013).

A lipidômica começa com a identificação e quantificação dos lipídios que coletivamente compreendem o lipidoma (a coleção das espécies moleculares lipídicas) em células, tecidos ou fluídos biológicos de interesse. Através da identificação e quantificação das alterações em espécies lipídicas, obtêm-se uma informação fundamental sobre o estado metabólico, nutricional e

funcional dos tipos celulares de interesse (GROSS e HAN, 2011). Além disso, o campo lipidômico engloba os papéis de constituintes lipídicos específicos na mediação da formação das balsas (*rafts*) lipídicas, na facilitação de interações entre redes de sinalização de proteínas (como proteína G) e fornecendo bases moleculares altamente especializadas para a construção de estruturas bioquímicas necessárias para os processos vitais (KLOSE *et al.*, 2010).

Um grande número de doenças atuais como diabetes, obesidade, aterosclerose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral são desordens relacionadas a lipídios (UNGER, 2002; DIXON, 2010; UNGER *et al.*, 2010). Deste modo, a lipidômica fornece uma perspectiva direta e única para verificação de alterações patológicas nas vias regulatórias celulares envolvendo os lipídios que promovem estas doenças. A lipidômica também tem-se firmado como um campo já capaz de identificar biomarcadores que predizem estados patológicos, podendo as alterações de perfis lipídicos refletirem o grau de desenvolvimento de uma doença e ser usado para determinar a eficácia de um tratamento (BARTZ *et al.*, 2007; NOMURA *et al.*, 2010; PORTER *et al.*, 2010). Portanto, através de uma abrangente análise de alterações nas espécies lipídicas e sua abundância, a lipidômica produz uma variedade de dados para diagnóstico, terapia e entendimento dos mecanismos envolvendo os lipídios, tanto nos processos naturais quanto patológicos (MANCUSO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010).

Os avanços recentes na área de espectrometria de massas, cromatografia e ressonância magnética nuclear (RMN) tem reforçado o rápido desenvolvimento de análises lipídicas de uma forma holística, com alta sensibilidade e possibilitando análises em larga escala (VAN MEER *et al.*, 2007). Porém, o desenvolvimento de metodologias capazes de detectar, identificar e quantificar os diversos tipos de lipídios presentes nos organismos constitui-se um problema, necessitando a união de algumas técnicas de análise estrutural para elucidação, como ESI-MS (ionização por *electrospray* acoplada à espectrometria de massas), APCI-MS (ionização química a pressão atmosférica acoplada com espectrometria de massas), CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e RMN (VAN MEER *et al.*, 2007).

### 2.3.3 Lipídios e *T. cruzi*

As membranas dos parasitas abrigam grande parte dos lipídios e apresentam função estrutural, bem como atuam em processos específicos como invasão da célula hospedeira, aquisição de nutrientes, e proteção contra o sistema imunológico (VIAL *et al.*, 2003). Na Figura 5 estão destacadas as principais organelas já descritas no gênero *Trypanosoma*.

Os protozoários kinetoplastida possuem uma superfície de membrana celular peculiar que pode ser dividida em pelo menos dois tipos morfologicamente distintos: bolsa flagelar e membrana plasmática (VIAL *et al.*, 2003).

Alguns exemplos do envolvimento dos lipídios em processos patogênicos na interação patógeno hospedeiro foram revisados por Christensen e Kolomiets (2011). Estes autores descrevem evidências de que alguns fungos fitopatogênicos são capazes de modular o metabolismo de lipídios do hospedeiro e obtê-los para sua utilização na biossíntese de moléculas envolvidas na elevação de sua virulência. Outro trabalho desenvolvido por Gimenez *et al.* (2010) aponta que lipídios obtidos de formas atenuada e virulenta de *Babesia bovis* são capazes de induzir ativação de macrófagos de forma diferencial.

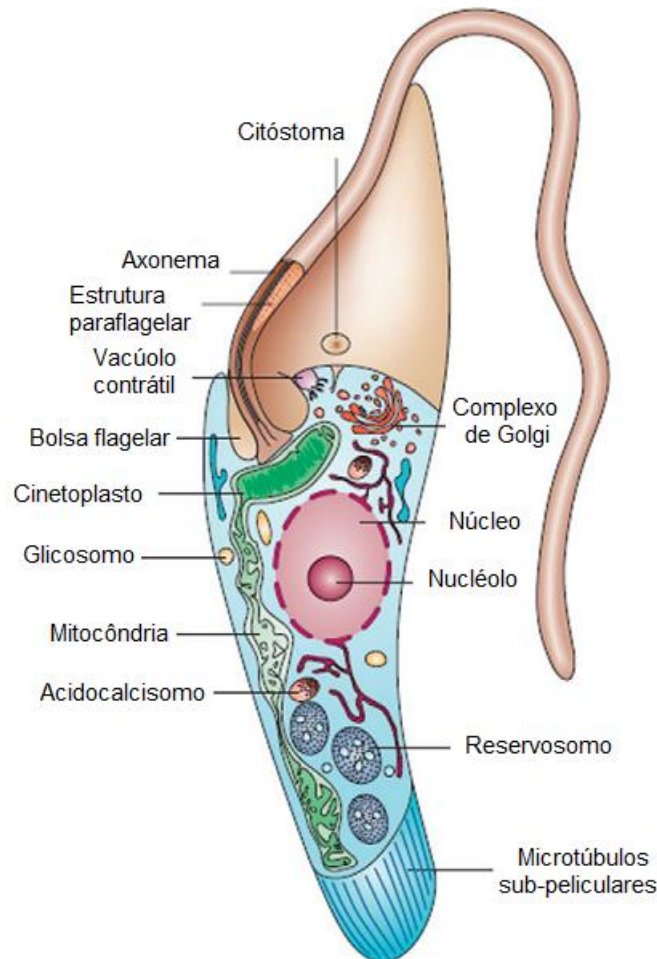


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SECÇÃO LONGITUDINAL DE UMA FORMA EPIMASTIGOTA DE *T. cruzi* DESTACANDO AS PRINCIPAIS ORGANELAS. Adaptado de DoCampo (2005).

A composição de lipídios por parte da célula hospedeira também interfere em diferentes níveis no processo infeccioso. Por exemplo, as balsas lipídicas de células humanas, que são ricas em esfingolipídios e colesterol, têm sido implicadas em mecanismos de infecção do HIV (RAWAT, JOHNSON e PURI, 2005).

Em *T. cruzi*, o favorecimento da invasão por formas infectivas devido à composição de colesterol e esfingolipídios da membrana da célula hospedeira também já foi demonstrado (FERNANDES *et al.*, 2007; PRIOTTO *et al.*, 2009). Há evidências de que a estratégia de entrada do *T. cruzi* na célula envolve mecanismos dependentes da presença de lipídios específicos na célula. Foi

observado que a extração do colesterol celular do hospedeiro reduz a infecção por *T. cruzi* e a capacidade de infecção é recuperada quando os níveis de colesterol são restaurados. O colesterol se acumula no sítio de entrada da forma tripomastigota metacíclica e da forma amastigota extracelular, acreditando-se que o colesterol está envolvido no processo de entrada do *T. cruzi* na célula. A diminuição do esterol do parasito diminui a infectividade da forma tripomastigota, porém ainda não está claro o papel deste esterol na cascata de sinalização (FERNANDES *et al.*, 2007).

Outro composto lipídico, tromboxano A<sub>2</sub> derivado de *T. cruzi*, tem sido relatado como um importante modulador da sobrevivência do parasita e progressão da doença de Chagas em hospedeiros mamíferos (ASHTON *et al.*, 2007).

As moléculas de superfície mais abundantes nas formas epimastigota e metacíclica de *T. cruzi* são os glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) (DE LEDERKREMER *et al.*, 1991; CARREIRA *et al.*, 1996; FERGUSON, 1997) e os glicosilfosfatidilinositóis (GPIs) ancorados com glicoproteínas de mucina (PREVIATO *et al.*, 1994; SERRANO *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.*, 1999). Há vários estudos que tratam da atividade destas moléculas no sistema imune do hospedeiro, agindo as GIPLs na redução da ativação de células T (GOMES *et al.*, 1996), enquanto aumenta a ativação de células B, a secreção de imunoglobulinas (BENTO *et al.*, 1996) e suprime a atividade de macrófagos e células dendríticas humanas (BRODSKYN *et al.*, 2002). As GIPLs também estão envolvidas na adesão à superfície luminal do intestino médio do *Rhodnius prolixus*, o inseto vetor que abriga a forma epimastigota. Neste caso, ainda, parece haver uma contribuição tanto da parte lipídica quanto glicídica da molécula (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Por outro lado, GPIs ancorados com glicoproteínas de mucina induzem a síntese de interleucina 12 (IL-12) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) por macrófagos murinos (CAMARGO *et al.*, 1997; GAZZINELLI *et al.*, 1997). Além disso, a porção GPI de glicoproteínas de mucina é suficiente para desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias (GAZZINELLI *et al.*, 1997).

### 2.3.3.1 Esteróis e *T. cruzi*

Os organismos eucarióticos necessitam de esteróis para sua sobrevivência (SCHROEPFER, 1981; BENVENISTE, 1986; SCHALLER, 2003). Os esteróis, como o colesterol nos animais, o estigmasterol em plantas e o ergosterol nos fungos (Figura 6) são essenciais para manter a estrutura de membranas, modulando sua fluidez e permeabilidade (HAINES, 2001). Além disso, os esteróis servem como precursores de moléculas biologicamente ativas, as quais regulam o crescimento celular (LEPESHEVA, VILLALTA e WATERMAN, 2011).

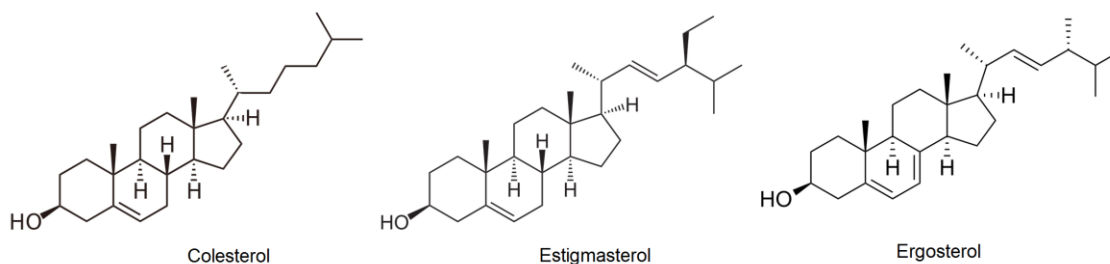


FIGURA 6 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO COLESTEROL, ESTIGMASTEROL E ERGOSTEROL.

Esteróis são produzidos apenas endogenamente pelas plantas, pela maioria dos fungos, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* ou então adquiridos pela dieta, no caso dos insetos, alguns fungos e protistas. Muitas espécies, incluindo humanos, leveduras e *Trypanosoma brucei* podem utilizar tanto esteróis de origem endógena quanto exógena para satisfazer sua necessidade para fins estruturais, porém os esteróis que são convertidos em moléculas com função regulatória são provenientes apenas de fonte endógena (LEPESHEVA *et al.*, 2010).

A biossíntese de esteróis pode ser considerada uma extensão eucariótica da via do mevalonato (VOLKMAN, 2005). Esta via começa com a condensação de acetil-CoA e procede com vários intermediários até produzir

farnesilpirofosfato (Figura 7). Na primeira etapa da biossíntese de esteróis farnesilpirofosfato forma esqualeno (Figura 7) e na presença de oxigênio molecular o esqualeno é transformado em esqualeno 2,3-epóxido. Contrariamente às plantas e algas onde este último é convertido em cicloartenol, nos animais, fungos e tripanossomatídeos ele se transforma em lanosterol (LEPESHEVA e WATERMAN, 2007; LEPESHEVA, VILLALTA e WATERMAN, 2011).

Em *T. cruzi* o lanosterol é primeiramente convertido em eburicol (C24-metileno-24, 25-dihidrolanosterol) o qual é substrato da esteroil 14 $\alpha$ -demetilase de *T. cruzi*, chamada também de CYP51 (LEPESHEVA *et al.*, 2006). O produto 14 $\alpha$ -demetilado da reação da CYP51 é então reduzido a 4,4-dimetil-fecosterol e depois demetilado novamente em C4, resultando em fecosterol (Figura 7). O rearranjo da dupla ligação na posição  $\Delta$ C8–9 e  $\Delta$ C7–8 produz o episterol; a introdução de uma dupla ligação no C5-6 gera o 5-dehidroepisterol. O grupo metileno em C24 do 5-dehidroepisterol é saturado formando 22,23-dihidroergosterol; a desaturação em  $\Delta$ C22–23 resulta na formação de ergosterol, o qual juntamente com seu análogo metilado em C24 representam os principais produtos da via.

Em eucariotos superiores, a biossíntese de esteróis ocorre no retículo endoplasmático e a maior parte destes esteróis concentram-se na membrana plasmática. Já em tripanossomatídeos a produção de esteróis, assim como a presença das enzimas da via, podem ser encontradas também nas membranas

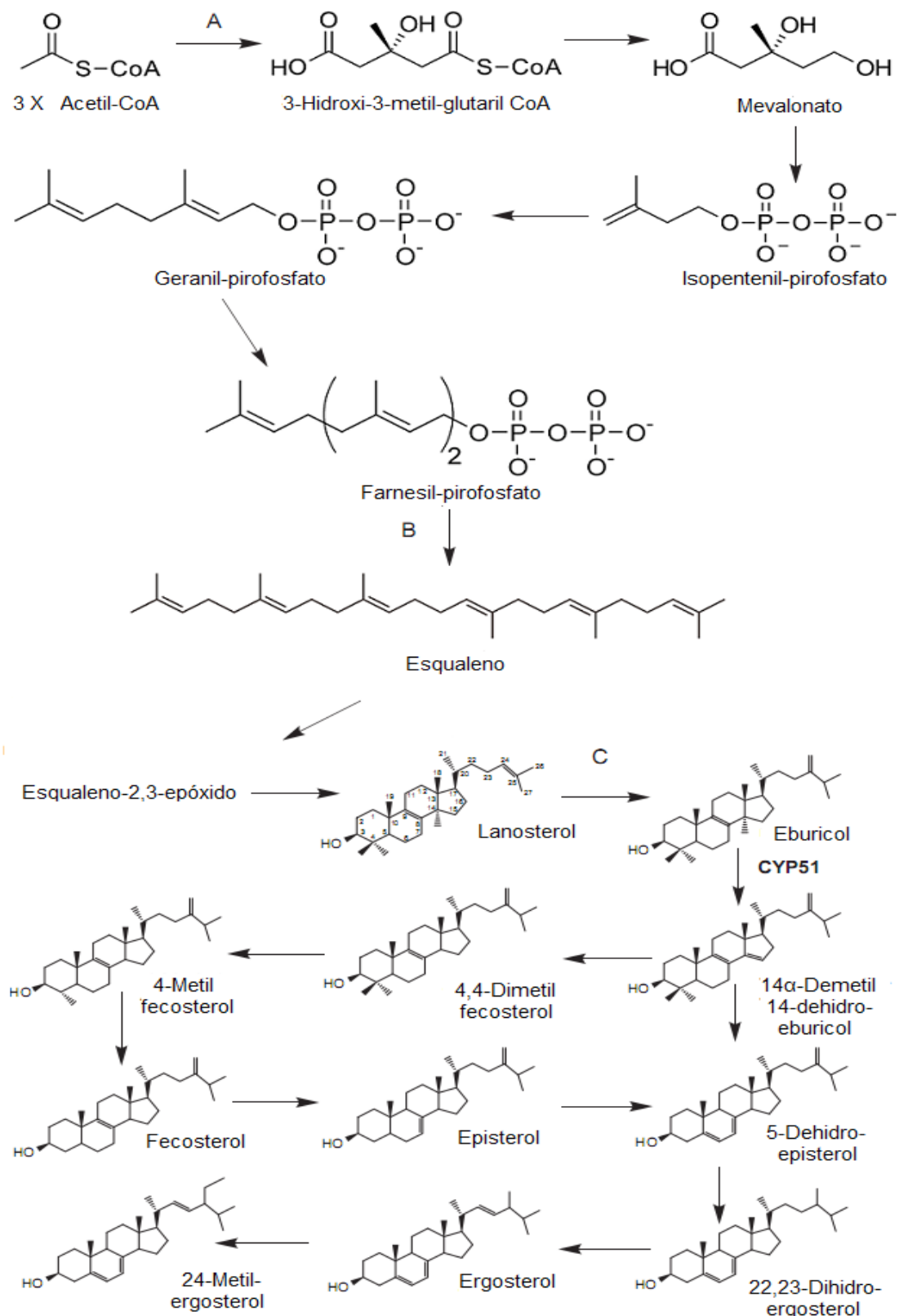


FIGURA 7 – VIA DE BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL EM *T. cruzi*. (A) ETAPA COM MEVALONATO. (B) PRIMEIRA FASE ESPECÍFICA EM EUCARIOTOS. (C) ETAPAS ESPECÍFICAS EM *T. cruzi*. Destaque para a enzima CYP51 (negrito). Adaptado de Lepesheva (2011).

dos glicossomos e das mitocôndrias, sugerindo assim uma localização múltipla da biossíntese de esteróis em parasitos (LEPESHEVA, VILLALTA e WATERMAN, 2011).

#### 2.3.3.1.1 Inibição da biossíntese de ergosterol

Sabendo-se que em *T. cruzi* há uma dependência endógena para suprir a necessidade de esteróis, temos então uma via muito importante para ser utilizada como alvo de fármacos. Existem várias enzimas nesta via que em breve podem se tornar alvos para uma terapia contra a doença de Chagas (Figura 9). Dentre elas podemos citar algumas que são também encontradas em humanos e fungos, as quais já são usadas para outros fins, como HMG-CoA redutase, que em humanos é alvo das estatinas (utilizadas no tratamento de hipercolesterolemia); farnesildifosfato sintase, que é alvo dos bifosfonatos (utilizados no tratamento da osteoporose); a esterol 24-metil-transferase que é alvo dos azasteróis (usados como antifúngico agrícola); C8 isomerase e  $\Delta 14$  esterol redutase que são inibidas pelos morfolinóis (antifúngico na agricultura) e esterol 14 $\alpha$ -demetilase (também chamada de CYP51), que é inibida pelos azóis, os quais são amplamente usados como antifúngicos em humanos como o cetoconazol, fluconazol e miconazol (Figura 8) (BUCKNER, 2008).

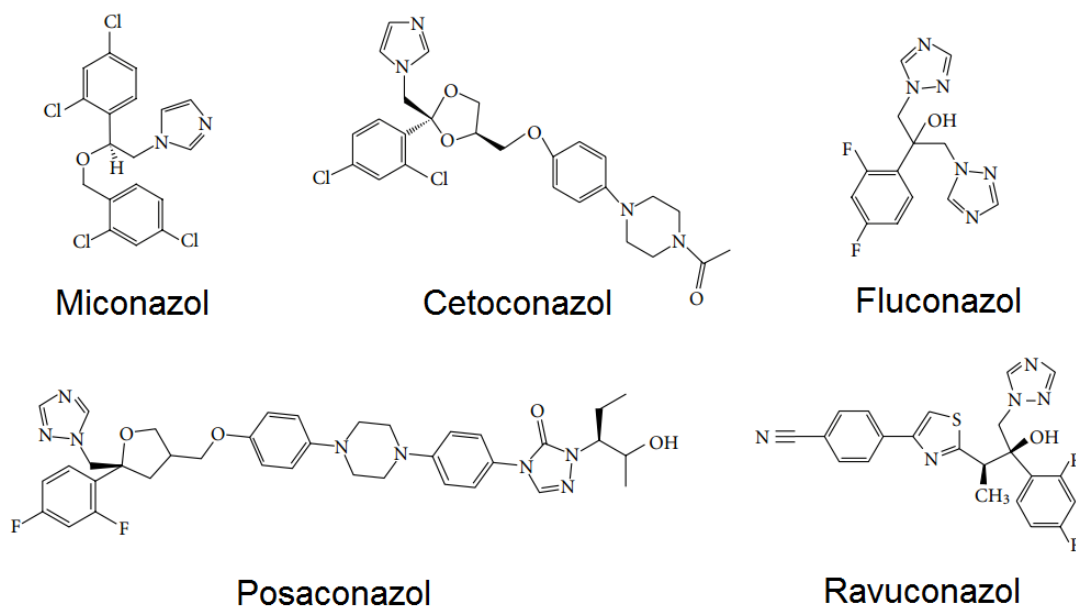


FIGURA 8 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS AZÓIS USADOS COMO ANTIFÚNGICOS. Adaptado de Vandeputte, Ferrari e Coste (2012).

Os azóis são os mais promissores nos ensaios que antecedem sua aprovação para uso clínico em doença de Chagas. Como exemplos temos o posaconazol que entrou na fase II de testes clínicos para tratamento de doença de Chagas na Espanha e o ravuconazol, que está em ensaios clínicos *Diseases Initiative* (DNDi) como uma opção para o tratamento de doença de Chagas (CLAYTON, 2010).

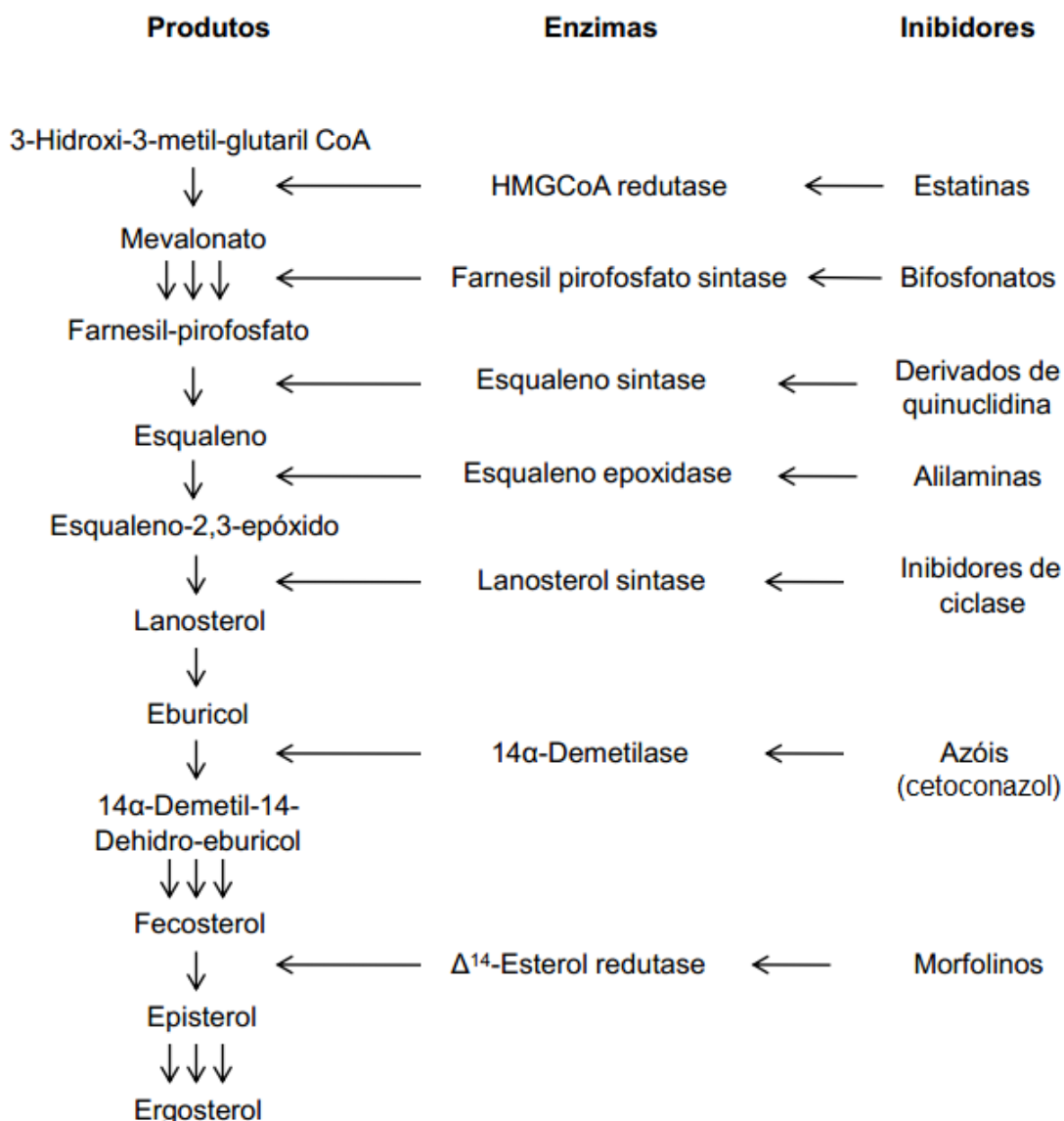


FIGURA 9 – VIA DE BIOSSÍNTESE DE ERGOSTEROL EM *T. cruzi*: PRODUTOS, ENZIMAS E INIBIDORES. AS SETAS DA CASCATA INDICAM A QUANTIDADE DE ETAPAS ATÉ O PRODUTO. Adaptado de Buckner (2008) e Lepesheva (2011).

Inúmeros trabalhos têm sido feitos avaliando-se os variados efeitos e eficácia no tratamento com azóis nas diferentes formas de *T. cruzi* (DOCAMPO *et al.*, 1981; BEACH, GOAD e HOLZ, 1986; URBINA *et al.*, 1988; CONTRERAS, VIVAS e URBINA, 1997; ARAUJO *et al.*, 2000; MOLINA *et al.*, 2000; URBINA *et al.*, 2000; DOYLE *et al.*, 2010). Alguns ainda têm

demonstrado o efeito curativo de certos azóis em modelos animais infectados agudamente e cronicamente com doença de Chagas (URBINA *et al.*, 1996; APT *et al.*, 1998; URBINA *et al.*, 2003; URBINA, 2009). Porém, um estudo lipidômico após o tratamento nunca foi relatado, ocorrendo apenas caracterizações lipídicas menos abrangentes (CONTRERAS, VIVAS e URBINA, 1997; URBINA *et al.*, 1998; DOYLE *et al.*, 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a necessidade de um melhor conhecimento a respeito do causador da doença de Chagas, um estudo amplo a respeito do perfil lipídico global e componentes relacionados (lipidômica) de *T. cruzi*, destaca-se como uma estratégia bastante promissora. Esta hipótese é ainda reforçada pelos estudos que já verificaram a importância que inúmeras espécies lipídicas desempenham nesta doença e na sobrevivência do parasito.

A utilização das tecnologias mais refinadas para conhecimento da composição lipídica global de protozoários permite realizar avanços que poderão resultar, em um futuro próximo, na identificação de novos alvos de fármacos possibilitando o desenvolvimento de métodos mais eficazes para o combate às parasitoses, tais como a doença de Chagas.

Ao se estudar a lipidômica de formas epimastigotas de *T. cruzi* e coanomastigotas de *A. deanei*, estamos dando um passo inicial para estudos mais avançados, tendo em conta a facilidade maior de se trabalhar com formas ou parasitos não infectivos a humanos. A caracterização e quantificação de lipídios na forma infectiva em humanos de *T. cruzi*, por exemplo, seria um importante ponto de comparação com a forma utilizada neste estudo e com *A. deanei*, a qual pertence à mesma família de *T. cruzi*.

A detecção de diferenças lipídicas entre cepas de *T. cruzi* é um ponto importante quando já se sabe de uma patogenicidade distinta entre certas cepas. Os efeitos globais na composição lipídica quando certas drogas agem neste parasito também se constitui um relevante estudo, principalmente quando já se tem em vista uma utilização clínica de tal droga.

Paralelamente, a identificação das perturbações bioquímicas causadas pela exposição do parasito a uma droga é crucial devido ao fato de podermos verificar potenciais mecanismos de sobrevivência/resistência ao tratamento. Desta forma, podemos identificar alvos alternativos para serem utilizados em combinações de drogas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar e comparar o lipidôma dos parasitos *T. cruzi* e *A. deanei*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o perfil lipídico total de formas epimastigotas de diferentes cepas/clones de *T. cruzi* pertencentes a três unidades de tipagem distintas (cepas/clones CL Brener, Sylvio, DM28c, Col17G2, Y e G).
- b) Avaliar quais alterações neste perfil são observadas quando *T. cruzi* é submetido ao tratamento em diferentes condições de um inibidor da biossíntese de ergosterol (cetoconazol).
- c) Comparar a composição lipídica total de *T. cruzi* com o tripanossomatídeo não infectivo a humanos, *A. deanei* e verificar neste diferenças quando crescido na ausência ou presença de soro fetal bovino e na ausência do endossimbionte (curada).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CULTIVO DOS PARASITOS, ENSAIO DE INIBIÇÃO E CURVA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

A forma epimastigota de quatro cepas e três clones de *T. cruzi* pertencentes a três diferentes UTDs (de acordo com o novo consenso classificatório para *T. cruzi* de Zingales *et al.* (2009): *T. cruzi* I para DM28c [clone de DM28], Sylvio, G e Col17G2 [clone de Colombiana]; *T. cruzi* II para Y e *T. cruzi* VI para CL Brener [clone de CL]) juntamente com a forma coanomastigota de *A. deanei*, foram cultivadas em meio LIT (infuso de fígado 10 g/L; triptose 5 g/L; NaCl 4 g/L; KCl 400 mg/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g/L, glucose 1 g/L; e 3,76 mL/L de hemina (2 mg/mL em 0,2 M de NaOH) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por calor (ou na ausência de SFB no caso de alguns experimentos com *A. deanei*), penicilina e estreptomicina, sem agitação, a 28 °C em frascos de cultura apropriados. As culturas de *A. deanei* foram cedidas por Stenio Frago do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz (Curitiba, PR). As cepas/clones de *T. cruzi*: Y, DM28c, Sylvio, CL Brener e Col17G2 foram provenientes do laboratório de Santuza Maria Ribeiro Teixeira do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG (Belo Horizonte, MG) enquanto que a cepa G foi cedida por Renato Arruda Mortara do Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia da UNIFESP (São Paulo, SP). A metodologia usada para obtenção de *A. deanei* curada (sem a presença do endossimbionte bacteriano) foi descrita por Mundim e Roitman (1977). As culturas em sua fase logarítmica de crescimento ( $1,5 \times 10^7$  epimastigotas/mL para *T. cruzi*,  $8 \times 10^7$  coanomastigotas/mL para *A. deanei* e  $4 \times 10^7$  coanomastigotas/mL para um experimento de composição de ácidos graxos em *A. deanei*) e em volume aproximado de 70 e 100 mL para *T. cruzi* e *A. deanei* respectivamente, foram separadas por centrifugação a 2000 g por 10 min, lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato salino) e congeladas à -20 °C.

Para os ensaios de inibição, o clone DM28c de *T. cruzi* foi inicialmente crescido até atingir concentração de  $2 \times 10^6$  epimastigotas/mL, quando então uma solução de cetoconazol preparada de acordo com Contreras *et al.* (1997) foi adicionada às culturas em diferentes concentrações e permanecendo por tempos de exposição distintos (1  $\mu$ M por 24 e 72h; 10  $\mu$ M por 72h). Os parasitos em volume suficiente foram centrifugados, lavados e congelados conforme já descrito anteriormente.

A curva de inibição de crescimento foi feita com dois clones de *T. cruzi* (DM28c e CL Brener) e duas concentrações de cetoconazol (1 e 10  $\mu$ M). Ela iniciou-se com  $5 \times 10^5$  parasitos/mL e a droga foi adicionada no dia 1 (com aproximadamente  $2 \times 10^6$  parasitas/mL). Quando o controle atingiu  $2 \times 10^7$  parasitos/mL ou mais, a cultura foi diluída para  $5 \times 10^5$  parasitos/mL e a proporção da diluição foi mantida para as demais culturas. Na terceira diluição (dia 10) optou-se por não diluir mais devido a ausência de crescimento observado através da contagem em câmara de Neubauer.

## 5.2 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS

Para se extrair as frações lipídicas dos parasitos os mesmos foram submetidas à lise por choque térmico, sendo submergidos em nitrogênio líquido a  $-199$  °C por 2 minutos e retornando a temperatura de  $37$  °C pelo mesmo período. Feito isso, uma quantidade pré-determinada e igual para as amostras foi pesada (aproximadamente 20 mg) e transferida para um tubo de vidro com tampa rosqueada de teflon e volume de 4 mL. Os parasitos foram submetidos à extração com uma mistura de 2 mL de clorofórmio:metanol (1:1, v/v), a temperatura de  $100$  °C por 2 horas, sem agitação (FOLCH, LEES e SLOANE STANLEY, 1957; CABRINI *et al.*, 1992; LIN *et al.*, 2004). O extrato lipídico foi centrifugado a 8000 g, o solvente orgânico contido no sobrenadante recolhido e com este extrato foram realizadas as derivatizações e análises.

### 5.3 DERIVATIZAÇÃO PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das amostras (dissolvidas em 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 1:1 v/v) foram evaporadas e metanolizadas com MeOH-HCl 3N (2:1, v/v) a 100  $^\circ\text{C}$  por 2h, a fim de se obter os metil ésteres de ácido graxo (MEAG). Após isso, as amostras foram submetidas a uma partição utilizando 1 mL de hexano e adicionando 0,5 mL de água destilada para facilitar a separação das fases. A fase apolar (hexano) foi coletada, evaporada e dissolvida em acetona. Para determinação da composição de esteróis, 50  $\mu\text{L}$  de amostra foram evaporados e derivatizados com N,N-bis(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (BSTFA)-piridina (2:1, v/v) por 30 min a 100  $^\circ\text{C}$  e injetada diretamente no equipamento de CG-EM. O reagente BSTFA usado foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

### 5.4 ANÁLISES DE CG-EM

A análise de CG-EM foi realizada utilizando cromatógrafo a gás Varian: 3800 acoplado a um detector de MS 4000, com detector de massa do tipo *ion trap*. Este equipamento possui uma coluna capilar baixo sangramento/MS (VF-1MS) dimensões de 30 m  $\times$  0,25 mm de diâmetro interno (adquirida da empresa Agilent/Varian, Santa Clara, CA, EUA). A detecção por massas foi realizada através de ionização eletrônica (70 eV). Para análise de ácidos graxos a temperatura do injetor foi mantida em 250  $^\circ\text{C}$  e do *trap* em 200  $^\circ\text{C}$ , Hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL/min e a programação da coluna foi a seguinte: inicial a 50  $^\circ\text{C}$ , mantido por 2 min, aquecido a 90  $^\circ\text{C}$  (20  $^\circ\text{C}$  por min, mantida durante 1 min) e em seguida a 280  $^\circ\text{C}$  (5  $^\circ\text{C}$  por min, mantida durante 2 min). Para análise de esteróis foram utilizadas as seguintes condições: injetor a 250  $^\circ\text{C}$ , a coluna foi mantida inicialmente a 200  $^\circ\text{C}$  por 1 min e então aquecida até 300  $^\circ\text{C}$ , numa taxa de 15

°C por min e mantida por 15 min (DOYLE *et al.*, 2010). O volume de injeção para ambas análises foi de 1 µL, com uma razão de *split* de 1:10. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software Saturn 5.1.

Uma estimativa do nível de insaturação (DBI, *double-bond index*), para ácidos graxos C18 e C16 foi calculado dos valores obtidos em mol% da análise de CG-EM, de acordo com o descrito por Skoczowski *et al.* (1994).

## 5.5 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Espectros de 1D e 2D de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker *Avance III* 400, operando a 9,4 Tesla equipado com uma sonda multinuclear de observação inversa de 5 mm e gradiente de campo no eixo z. Antes das análises, as amostras foram submetidas à troca de H por D, por sucessivas solubilizações e evaporações em solventes deuterados. Em seguida foram solubilizadas em 500 µL de uma solução de  $\text{CDCl}_3$ :MeOD (1:1, v/v), centrifugadas e transferidos para tubos de RMN de 5 mm para aquisição dos experimentos de RMN. Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram referenciados em relação ao sinal do TMS em 0,00 ppm. Os experimentos foram realizados sem a rotação do tubo, com o sinal de TMS a uma largura média variando de 0,8-1,0 Hz.

Experimentos de RMN 2D foram realizadas usando as seguintes sequencias de pulsos: HSQC editado (*heteronuclear correlation via double inept transfer*) com desacoplamento durante a aquisição, com edição de multiplicidade durante a etapa de seleção (*hsqcedetgp*), COSY, correlação homonuclear com pré-saturação durante o atraso de relaxamento utilizando gradiente de pulsos de seleção (*cosygpprf*), TOCSY, correlação homonuclear total através de transferência Hartman-Hahn usando a sequência MLEV17 para o tempo de mistura, utilizando-se um tempo de mistura de 0,06 s (*mlevphpr.2*), e HMBC correlação heteronuclear via zero e dupla coerência quântica

otimizada para acoplamentos de longo alcance (hmbcgp1pndqf). Os experimentos de RMN 2D foram adquiridos com detecção de quadratura na dimensão indireta, sendo que os experimentos de HSQC editado foram adquiridos com 128 scans por série de 1K x 256 pontos com zero de *filling* na dimensão F1 (4 K) antes de transformada de Fourier (SASSAKI *et al.*, 2011).

### 5.5.1 Redução dos dados e Análise por Componentes Principais (ACP)

Após a correção da fase e linha de base, cada espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi reduzido a 597 regiões de igual largura (0,01 ppm) usando o *software* AMIX (análise de misturas), versão 3.8 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Alemanha). A janela de  $^1\text{H}$  utilizada foi de 0,5 a 6,50 ppm. A região espectral próxima à ressonância do metanol ( $\text{CHD}_2\text{OD}$ ,  $\delta$  3,32-3,36 ppm) foi removida de todos os conjuntos de dados antes de normalização e análise multivariada, a fim de eliminar variações derivadas de possíveis irregularidades da supressão da água ou heterogeneidades do sinal do solvente. Após uma análise de ACP preliminar, as regiões correspondentes as ressonâncias dos grupos  $\text{R-CH}_3$  ( $\delta$  0,84-0,91),  $(\text{CH}_2)_n$  ( $\delta$  1,20-1,41 ppm), Ala-C $\beta$  ( $\delta$  1,50-1,57), succinato ( $\delta$  2,58-2,61) e  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  ( $\delta$  3,19-3,25) também foram removidas dos conjuntos de dados (informando-se quando feita), principalmente porque pequenas deformações dos sinais nesta região interferiram significativamente na ACP, devido à elevada intensidade dos sinais nesta região. Todas as regiões dentro da janela analisada remanescentes dos espectros foram analisadas em *pareto scaling*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* NA PRESENÇA DE CETOCONAZOL

A fim de avaliar se parasitos de diferentes grupos apresentam susceptibilidade diferenciada ao tratamento com cetoconazol, foram testados o comportamento dos clones CL Brener (*T. cruzi* VI – genoma sequenciado) e DM28c (*T. cruzi* I – genoma em fase de montagem) (Figura 10). O efeito do inibidor foi bastante semelhante entre as cepas, sendo mais acentuado após 4 dias de crescimento. Diante disto, optou-se por usar as concentrações testadas na curva (1 e 10  $\mu\text{M}$  de cetoconazol) nos demais experimentos analíticos, assim como determinados tempos de exposição à droga (24 e 72h).

### 6.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE *T. cruzi* E *A. deanei* POR RMN DE $^1\text{H}$ E CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

Os espectros de RMN de hidrogênio do clone DM28c controle e tratado com cetoconazol mostraram-se bastante semelhantes (Figura 11A e 11B), exceto as diferenças mais acentuadas relativas ao acúmulo de eburicol – um precursor da biossíntese de ergosterol – e uma redução no deslocamento de C18 correspondente ao colesterol, após o tratamento. A presença de colesterol no extrato evidencia uma provável captação dele do meio de cultura, já que em tripanossomatídeos a biossíntese de colesterol não ocorre (LEPESHEVA *et al.*, 2010). Os assinalamentos lipídicos foram feitos combinando-se os dados de RMN uni e bidimensional, além do suporte da literatura consultada (CASU *et al.*, 1991; CHOI, CASU e GIBBONS, 1993; ADOSRAKU *et al.*, 1994; WILLKER e LEIBFRITZ, 1998; COEN *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2009; BECKONERT *et al.*, 2010).

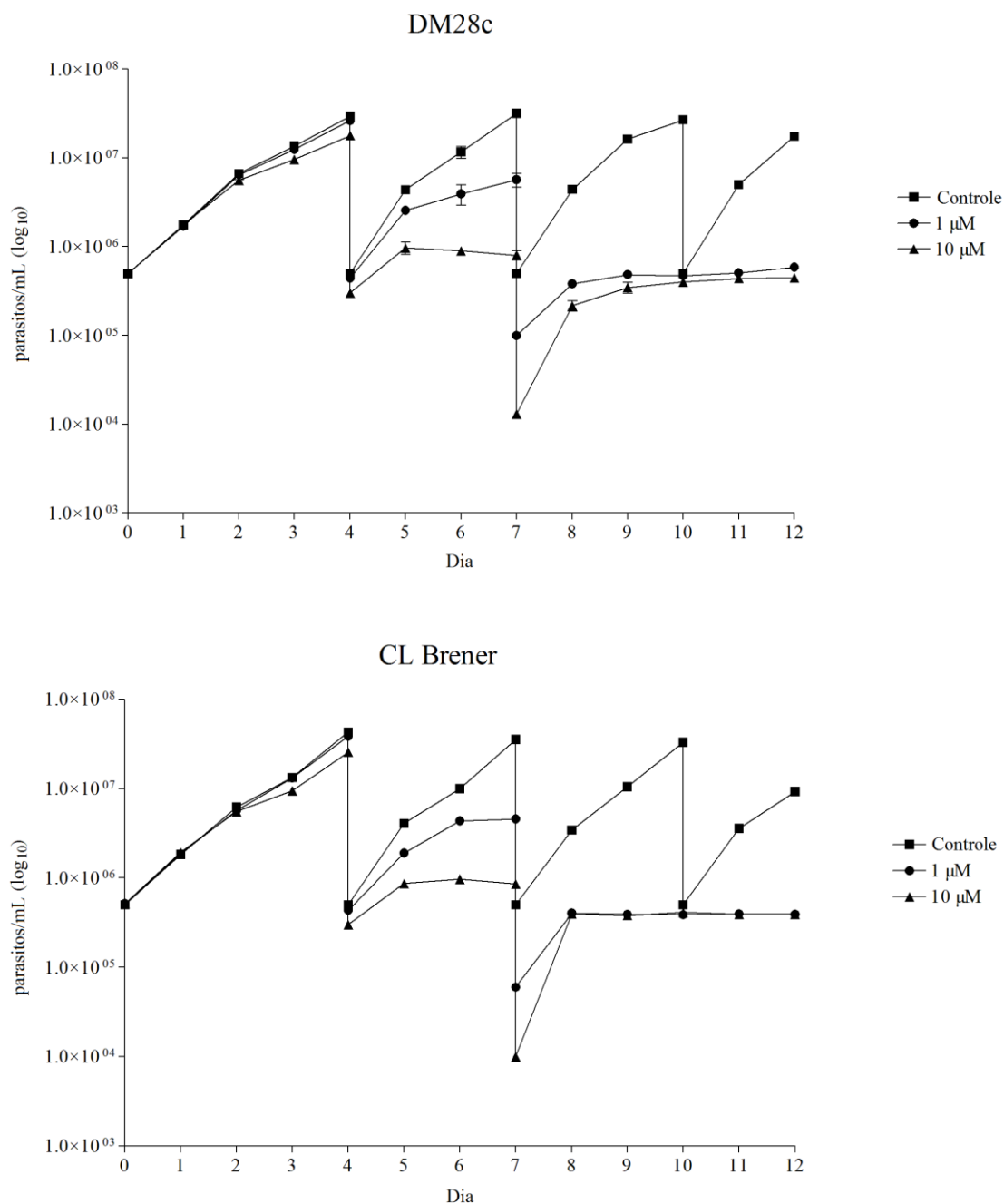


FIGURA 10 – EFEITO INIBITÓRIO DE CETOCONAZOL NA TAXA DE CRESCIMENTO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* DOS CLONES DM28c E CL BRENER. Os parasitos foram crescidos na presença de 0, 1 e 10  $\mu$ M da droga. Quando o controle atingiu  $2 \times 10^7$  parasitos/mL ou mais, a cultura foi diluída para  $5 \times 10^5$  parasitos/mL e a proporção da diluição foi mantida para as demais culturas. Na terceira diluição (dia 10) optou-se por não diluir mais devido a ausência de crescimento. Os resultados expressam a média de três experimentos independentes. Os desvios padrões das contagens foram iguais ou menores a 10% das médias.

Um dado complementar para verificação dos efeitos da droga em *T. cruzi* foi a análise e comparação das integrais obtidas pelo experimento de HSQC-ed das culturas controle e tratada (Tabela 3), mostrando as principais variações que ocorreram entre determinados componentes. Destaca-se nessa análise uma redução de 58,1% na integral de colesterol acetato (ChA-C6), de 61,6% em cistina (Cys-C $\beta$ ), de 29,6% em colesterol (Chol-C18) e 10,2% em fosfatidiletanolamina (PE-2') após o tratamento, ao passo que houve um aumento de 18,9% em fosfatidilinositol (PI-6') e 4,5% em fosfatidilcolina (PC-1') (Tabela 3).

Os espectros de RMN de hidrogênio das demais cepas e clones foram bastante semelhantes e por isso uma análise visual do espectro não revelou muitas diferenças, fazendo-se necessário recorrer à análise por componentes principais a fim de detectá-las (Figura 12).

A fim de termos uma noção geral das prováveis diferenças entre espécies da mesma família, verificamos o espectro de hidrogênio do outro tripanossomatídeo – *A. deanei* – crescido na presença de 10% de SFB e sem o endossimbionte (curada). Destacou-se neste caso a ausência do assinalamento característico de colesterol em 0,70 ppm quando comparado com *T. cruzi* (Figura 11A, 11C e 11D), indicando que em *A. deanei* não ocorre (ou ocorre pouca) captação de colesterol do meio de cultura, diferentemente de *T. cruzi*. Um assinalamento relevante no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi observado em -0,32 ppm (não mostrado na figura) e que é característico de anel ciclopropano de ácido graxo em *cis* (WOOD e REISER, 1965; OUDEJANS, VAN DER HORST e VAN DONGEN, 1971; FISH *et al.*, 1981). Tal dado foi confirmado pela análise feita por CG-EM (Tabela 2) que apresentou tempo de retenção e fragmentos característicos ( $m/z$  310 [ $\text{M}^+$ ], 278, 236, 194) de um ácido graxo ciclopropano C19, *cis*-9,10-ácido metilenoctadecanóico (WOOD e REISER, 1965; FISH *et al.*, 1981).

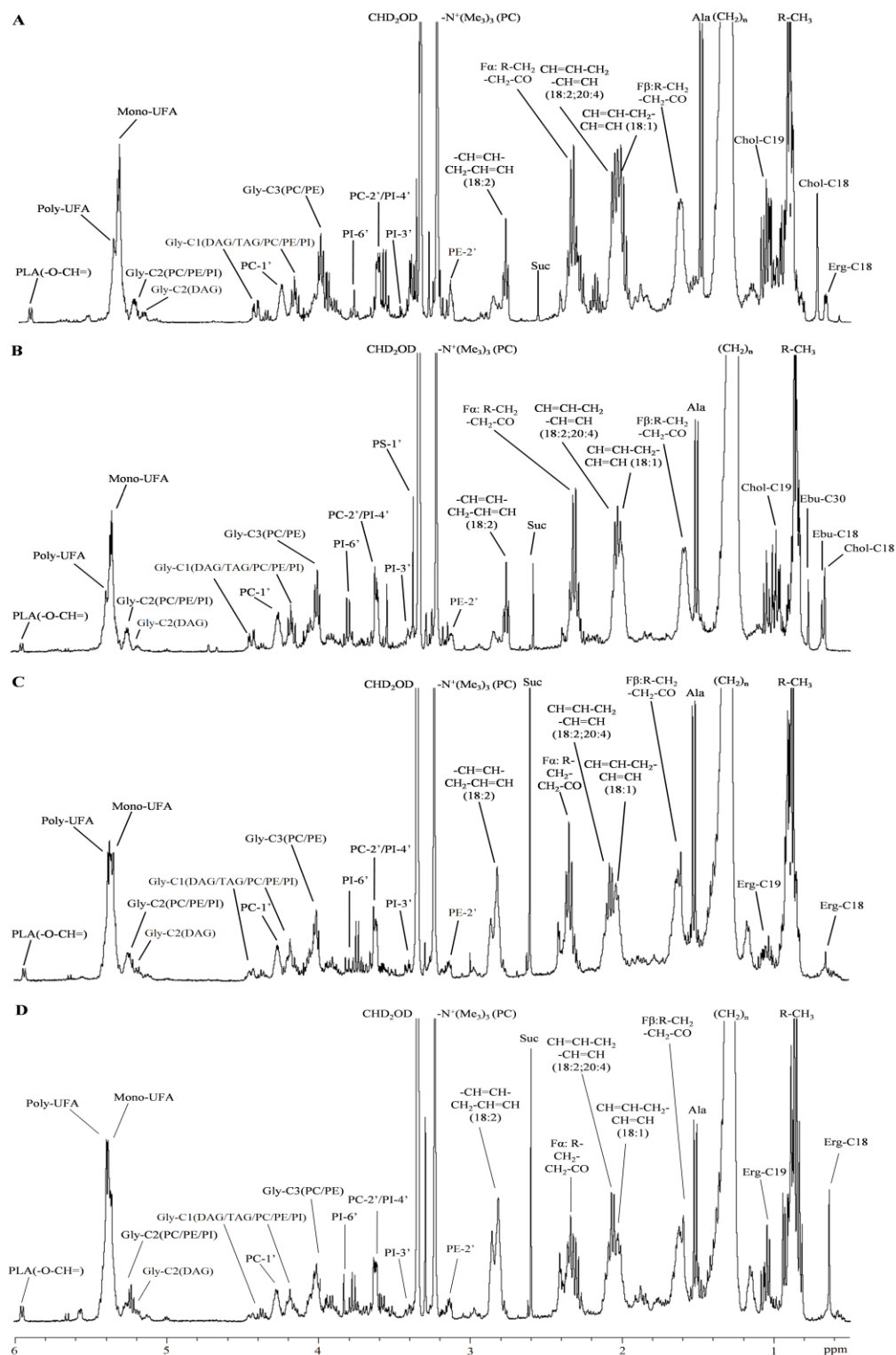


FIGURA 11 – ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DOS EXTRATOS LIPÍDICOS OBTIDOS DO CLONE DM28c DE *T. cruzi* CONTROLE (A), CLONE DM28c TRATADO COM CETOCONAZOL NA CONCENTRAÇÃO DE  $1\mu\text{M}$  POR 72h (B), *A. deanei* CRESCIDA NA PRESENÇA DE 10% DE SFB (C) E *A. deanei* CURADA (D). Os deslocamentos químicos são relativos ao padrão interno de TMS ( $\delta = 0$  ppm). Os valores dos assinalamentos químicos e as abreviações utilizadas encontram-se na Tabela 1.

*A. deanei* curada apresentou um sinal intenso em C18 de ergosterol (0,65 ppm) quando comparado com o espectro de *A. deanei* crescido na presença de 10% de SFB (Figura 11C e 11D). Os demais assinalamentos que diferenciam os espectros de hidrogênio mostrados são mais bem observados na análise quimiométrica realizada por componentes principais, tanto para o clone DM28c de *T. cruzi* tratado e controle (Figura 15), tanto de *A. deanei* (Figura 14).

Com algumas poucas exceções, todas as classes lipídicas presentes nos extratos analisados puderam ser identificadas na análise de RMN de hidrogênio e também através dos experimentos de correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ed, confirmando a identificação dos deslocamentos químicos sobrepostos (Figura 12 e Tabela 1).

### 6.3 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A análise por componentes principais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi feita com o objetivo de detectar diferenças que não puderam ser assinaladas visualmente entre as diversas amostras. Epimastigotas de *T. cruzi* (DM28c, CL Brener, G, Y, Col17G2 e Sylvio) foram discriminadas principalmente pelo primeiro componente principal gerado (PC1), o qual explicou 53% da variância. Os extratos lipídicos mostraram uma alta reprodutibilidade entre cada cepa, como se pode observar nos *scores plot* (Figura 13.1). Entre as classes lipídicas, os picos que influenciaram a discriminação em PC1 foram R-CH<sub>3</sub> (0,84-0,91 ppm), (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (1,20-1,41 ppm), N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC) (3,19-3,25 ppm), e Ala-Cβ (1,48-1,54 ppm) quando nenhuma região do espectro foi excluída (Figura 13B2 e 13B3) e PS-1' (3,37 ppm), Mono-UFA (5,34 ppm), Gly-C3(PC/PE) (4,01 ppm), Chol-C17 (1,08-1,10 ppm) e C18:1 (2,01-2,03 ppm) quando as regiões correspondentes a R-CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC), e Ala-Cβ foram excluídas (Figura 13C2 e 13C3).

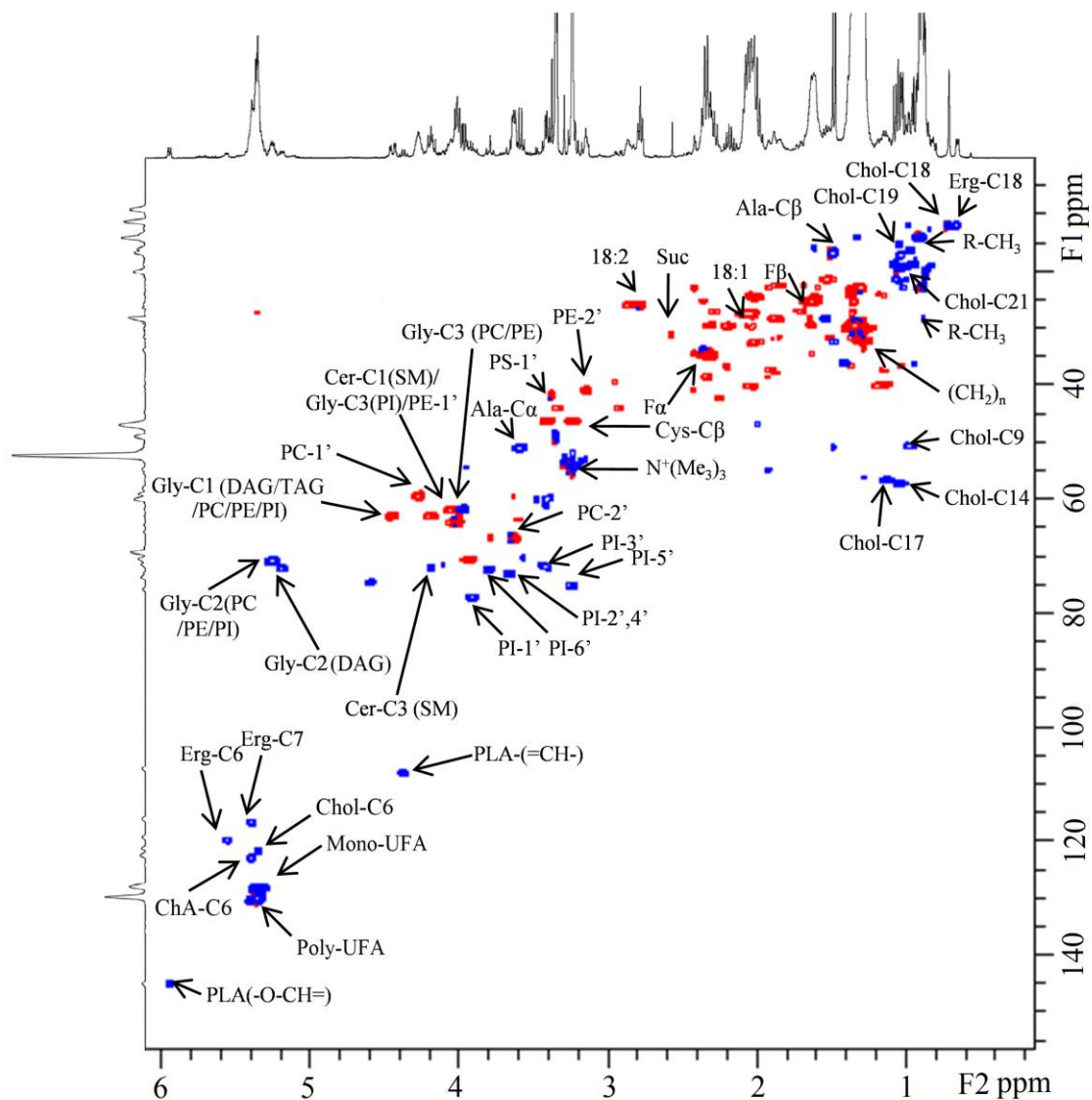


FIGURA 12 – MAPA PARCIAL DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  OBTIDO DE EXPERIMENTO DE HSQC-ed DO EXTRATO LIPÍDICO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* (DM28c) COM OS PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS. A fase positiva (em azul) corresponde às correlações de primeira ordem de tipo CH e  $\text{CH}_3$ , enquanto a fase negativa (em vermelho) corresponde às correlações de primeira ordem de tipo  $\text{CH}_2$ . Um assinalamento mais detalhado e as abreviações utilizadas estão presentes na Tabela 1.

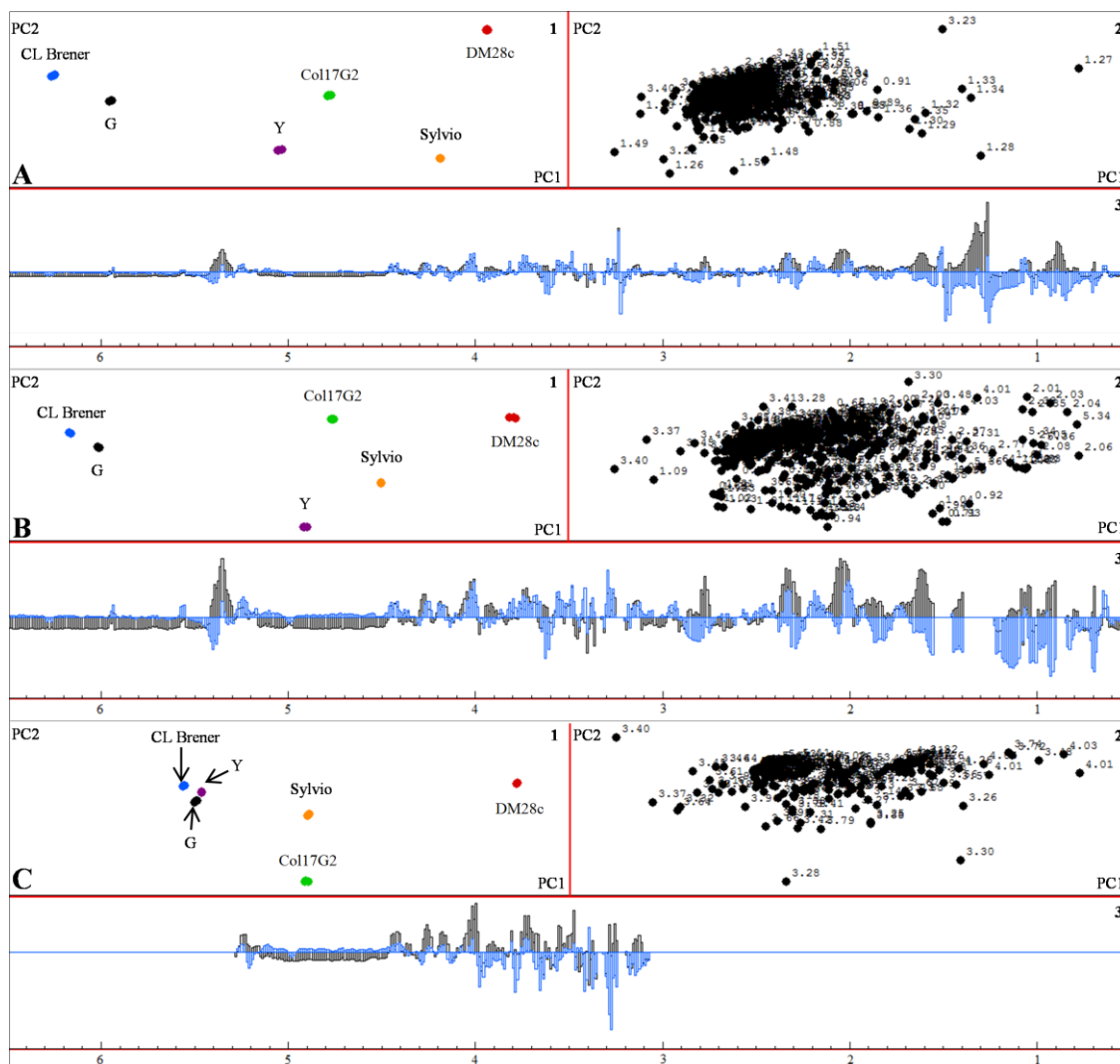


FIGURA 13 – Scores plot DE ACP FEITA DE INFORMAÇÃO OBTIDA DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*: DM28c, CL BRENER, G, Y, Col17G2 E SYLVIO (1), LOADINGS PLOT (2) E 1D LOADINGS PLOT DE PC1 (PRETO) E PC2 (AZUL) (3). A: NENHUMA REGIÃO EXCLUÍDA; B: REGIÕES CORRESPONDENTES A R-CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, ALANINA E N<sup>+</sup>(ME<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC) FORAM EXCLUÍDAS; C: APENAS REGIÃO CORRESPONDENTE MAJORITARIAMENTE A FOSFOLIPÍDIOS FOI SELECIONADA (3,24-5,40 ppm). A ACP foi realizada conforme condições descritas na seção de Materiais e Métodos.

Pela análise por CG-EM foi possível confirmar a discriminação em C18:1 entre as cepas e clones de *T. cruzi*, onde observamos a mais alta porcentagem em CL Brener (29,13) e a mais baixa em Y (17,79) (Tabela 2). A análise por componentes principais demonstrou mais claramente também as

diferenças entre classes lipídicas específicas como os fosfolipídios (Figura 13C), sendo Gly-C3(PC/PE) (4,01 ppm), Cer-C1(SM)/Gly-C3(PI)/PE-1' (4,03-4,04 ppm), PS-1' (3,37 ppm) e um sinal em 3,30 ppm pertencendo provavelmente a uma colina, como aqueles que mais influenciaram a discriminação.

Foi realizada também a ACP comparando-se *A. deanei* cultivada na presença ou ausência de SFB e *A. deanei* curada, para verificação das principais diferenças e influência do SFB e do endossimbionte no perfil lipídico (Figura 14A e 14B). O PC1 gerado neste caso foi capaz de explicar 55% da variância. Pode-se observar uma alta reprodutibilidade entre as diferentes culturas de *A. deanei* analisadas através dos *scores plot* (Figura 14A1 e 14B1). Os deslocamentos químicos que mais influenciaram a diferenciação em PC1 foram R-CH<sub>3</sub> (0,84-0,91 ppm), (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (1,20-1,41 ppm), N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC) (3,19-3,25 ppm), PS-1' (3,37 ppm), 3,30 ppm (provável colina) e succinato (2,60 ppm) quando nenhuma região de exclusão foi selecionada (Figura 14A2 e 14A3) e Fα (2,27-2,39 ppm), PS-1' (3,37 ppm), Erg-C19 (1,06 ppm), 3,30 ppm (provável colina) e Mono-UFA (5,34 ppm) quando as regiões de R-CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC), succinato e Ala-Cβ foram excluídas (Figura 14B2 e 14B3).

Foi feita a ACP com o objetivo de comparar o espectro de RMN de <sup>1</sup>H do clone DM28c de *T. cruzi* com *A. deanei* crescida com e sem SFB. Esta verificação assinalou as principais classes lipídicas diferentes entre estes parasitos pertencentes à mesma família. PC1 foi capaz de explicar 93% da variância encontrada, sendo assim o componente mais importante na discriminação entre as amostras. Os deslocamentos químicos que mais influenciaram a diferenciação foram R-CH<sub>3</sub> (0,84-0,91 ppm), (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (1,20-1,41 ppm), N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC) (3,19-3,25 ppm), PS-1' (3,37 ppm), Ala-Cβ (1,48-1,54 ppm) e succinato (2,60 ppm) (Figura 14C2 e 14C3) e após a exclusão das regiões R-CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC), succinato e Ala-Cβ, obtivemos PS-1' (3,37 ppm), Poly-UFA (5,36 ppm), Fα (2,27-2,39 ppm), C18:2 (2,76-2,86 ppm) e a provável colina (3,30 ppm) como os sinais que mais influenciaram a discriminação (Figura 14D2 e 14D3).

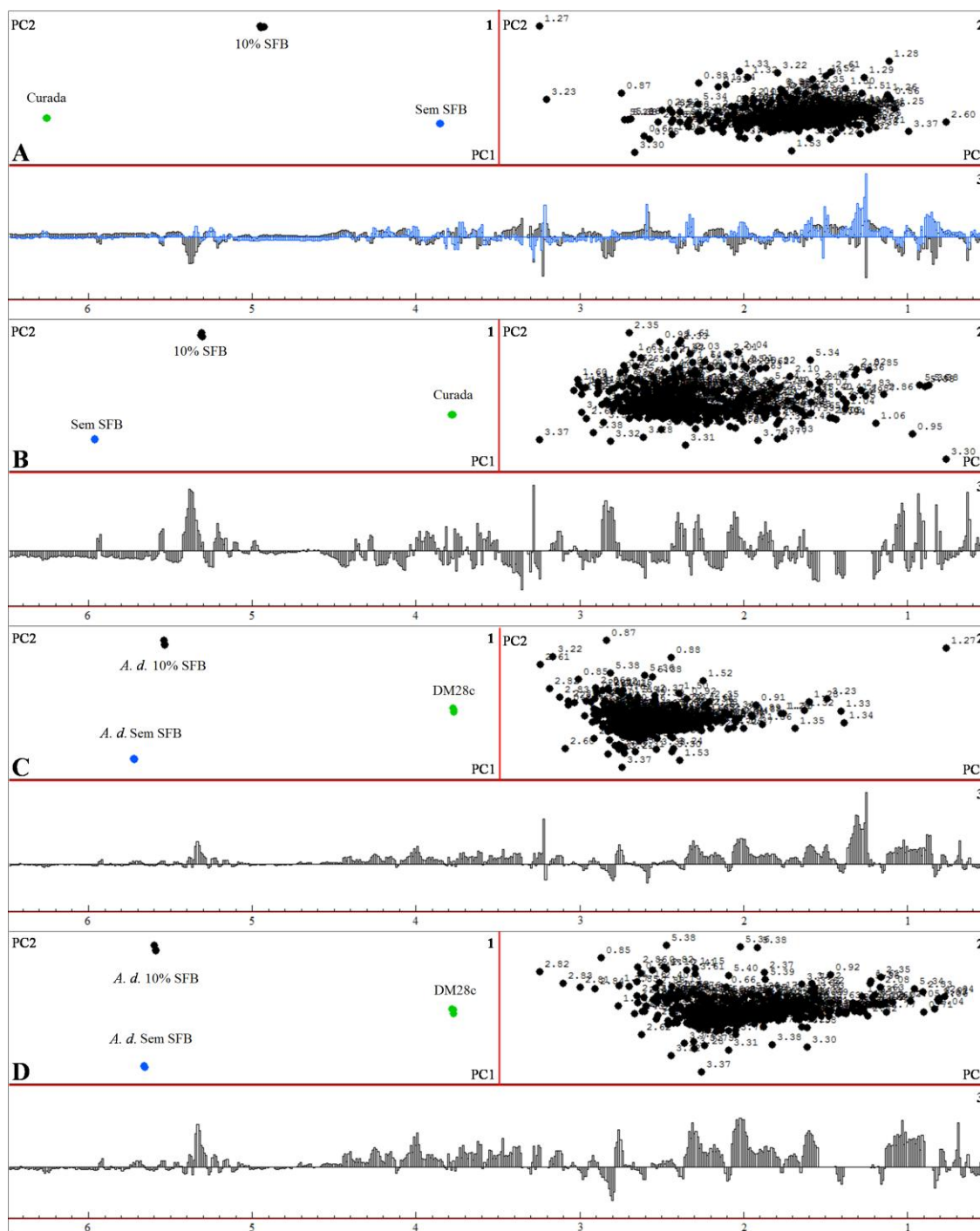


FIGURA 14 – ACP DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  OBTIDOS DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE *A. deanei* CRESCIDA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SFB E CURADA (QUADROS A E B); ACP DE *A. deanei* CRESCIDA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SFB E DM28c DE *T. cruzi* (QUADROS C E D). A e C: nenhuma região excluída do espectro. B e D: regiões correspondentes à R-CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC) alanina e succinato excluídas. Scores plot (1), Loadings plot (2) e Loadings plot 1D de PC1 (preto) e PC2 (azul) (3). A ACP foi realizada conforme condições descritas na seção de Materiais e Métodos.

TABELA 1 – ASSINALAMENTOS LIPÍDICOS DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  OBTIDOS A PARTIR DE HSQC-ED DO EXTRATO LIPÍDICO DO CLONE DM28c DE *T. cruzi* CONTROLE E TRATADO COM CETOCONAZOL. Abreviações: Chol, colesterol; Erg, ergosterol; ChA, colesterol acetato; Ala, alanina; Cys, cistina; Suc, succinato; Gly, glicérol; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; Cer, ceramida; SM, esfingomielina; DAG, diacilglicérol; TAG, triacilglicérol; Mono-UFA, ácido graxo monoinsaturado; Poly-UFA, ácido graxo poliinsaturado; PLA, plasmalógeno.

| Composto   | $\delta$ (ppm) $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | Varição* |
|--|---|----------|
| Erg-C18  | 0,65/12,01                                |          |
| Chol-C18   | 0,70/11,90                                | ↓29,6%   |
| Ebu-C18  | 0,72-0,73/15,91                           |          |
| Ebu-C30  | 0,81/15,59                                |          |
| R-CH <sub>3</sub>  | 0,84-0,91/14,08                           |          |
| Chol-C9  | 0,94/50,64                                |          |
| Chol-C14   | 1,02/57,20                                |          |
| Erg-C19/Chol-C19   | 1,06/15,38                                |          |
| Chol-C17   | 1,08-1,10/56,64                           |          |
| (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>                                    | 1,20-1,41/29,62                           |          |
| Ala-C $\beta$  | 1,48-1,54/16,81                           | ↓9,3%    |
| F $\beta$ :R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> -   | 1,56-1,67/25,21                           |          |
| -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH-CH-(18:1)                               | 2,01-2,03/27,44                           |          |
| F $\alpha$ : R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> - | 2,27-2,39/34,37                           |          |
| Suc  | 2,60/29,32                                | ↑82,2%   |
| -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(18:2)                               | 2,76-2,86/25,93                           |          |
| PE-2'  | 3,14/40,88                                | ↓10,2%   |
| -N <sup>+</sup> (Me <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (PC)               | 3,19-3,25/54,25                           |          |
| Cys-C $\beta$  | 3,22/46,31                                | ↓61,6%   |
| PI-5'  | 3,24/75,13                                |          |
| CHD <sub>2</sub> OD  | 3,34/49,01                                |          |
| PS-1'  | 3,37-3,38/41,81                           | ↓10,1%   |
| Cys-C $\alpha$   | 3,39/46,28                                |          |
| PI-3'  | 3,42-3,43/71,85                           |          |

TABELA 1 – Continuação.

| Composto                    | $\delta$ (ppm) $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ | Variação* |
|-----------------------------|---|-----------|
| Ala-C $\alpha$              | 3,56-3,60/50,92                             |           |
| PC-2'                       | 3,63/66,82                                  |           |
| PI-4'                       | 3,64/73,01                                  |           |
| PI-2'                       | 3,66/73,03                                  |           |
| PI-6'                       | 3,80/72,37                                  | ↑18,9%    |
| PI-1'                       | 3,88/77,26                                  |           |
| Cys-C $\alpha$              | 3,96/61,71                                  |           |
| Gly-C3(PC/PE)               | 4,01/61,84                                  |           |
| Cer-C1(SM)/Gly-C3(PI)/PE-1' | 4,03-4,04/61,87                             |           |
| Cer-C3(SM)                  | 4,18/72,09                                  |           |
| PC-1'                       | 4,27/59,46                                  | ↑4,5%     |
| PLA-(=CH-)                  | 4,36/108,07                                 | ↓8,8%     |
| Gly-C1(DAG/TAG/PC/PE/PI)    | 4,18-4,44/63,02                             |           |
| HOD/CD <sub>3</sub> OD      | 4,57  |           |
| Gly-C2 (DAG)                | 5,17/72,13                                  | ↓8,0%     |
| Gly-C2 (PC/PE/PI)           | 5,25/70,88                                  |           |
| Mono-UFA                    | 5,34/128,36                                 |           |
| Chol-C6                     | 5,34/121,77                                 |           |
| Poly-UFA                    | 5,36/130,28                                 |           |
| ChA-C6                      | 5,37/122,97                                 | ↓58,1%    |
| Erg-C7                      | 5,38/116,72                                 |           |
| Erg-C8                      | 5,55/119,95                                 |           |
| PLA (-O-HC=)                | 5,94/145,12                                 |           |

\*Porcentagem correspondente à variação encontrada em integral de HSQC-ed medida em cultura controle e após tratamento com cetoconazol, 1 $\mu$ M por 72h.

Para se avaliar os efeitos do cetoconazol no perfil lipídico de *T. cruzi*, procedemos a ACP dos espectros de hidrogênio do clone DM28c tratado com diferentes doses e tempo. PC1 explicou 76% da variância entre os espectros e

os assinalamentos que mais influenciaram a separação entre as amostras foram alanina, R-CH<sub>3</sub> (0,84-0,91 ppm), (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (1,20-1,41 ppm) e N<sup>+</sup>(Me<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(PC) (3,19-3,25 ppm) quando nenhuma região de exclusão foi selecionada (Figura 15A2 e 15A3). Após a exclusão dessas mesmas regiões encontradas anteriormente, obtivemos Ebu-C18 (0,73 ppm), Chol-C17 (1,09 ppm), Chol-C14 (1,02 ppm), Ala-C $\alpha$  (3,56-3,60 ppm) e PS-1' (3,37 ppm) como os deslocamentos que mais influenciaram a diferenciação (Figura 15B2 e 15B3). Com o objetivo de avaliar de maneira mais acurada os efeitos da droga, realizamos a seleção de regiões no espectro onde se encontram predominantemente deslocamentos de fosfolipídios (Figura 15C) e esteróis (Figura 15D). Os deslocamentos fosfolipídicos que mais influenciaram a discriminação foram PS-1' (3,37 ppm), PI-3' (3,42 ppm), PI-6' (3,80 ppm), PI-2' (3,66 ppm), Gly-C3(PC/PE) (4,01 ppm) e Cer-C1(SM)/Gly-C3(PI)/PE-1' (4,03-4,04 ppm) (Figura 15C2 e 15C3). Como esperado, o tratamento com cetoconazol inibiu a síntese de ergosterol e elevou os níveis de seu precursor, eburicol, sendo estes os deslocamentos que mais influenciaram a diferenciação na região dos esteróis (Figura 15D2 e 15D3). Entretanto, a presença destes esteróis é melhor avaliada na análise quantitativa feita por CG-EM (Tabela 2), assim como os efeitos na porcentagem de colesterol, que também foi uma diferença detectada na ACP já descrita (Figura 15B2 e 15B3).



#### 6.4 ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E ESTERÓIS POR CG-EM

A fim de se identificar e quantificar com outra técnica analítica a composição de certos compostos de interesse procedeu-se a verificação de ácidos graxos e esteróis de *T. cruzi* e *A. deanei* por CG-EM.

A composição de ácidos graxos das diferentes cepas e clones de *T. cruzi* analisados foram bastante similares, sendo a principal diferença relativa à composição de C18:1 entre CL Brener (29,06%) e Y (17,7%). Estudamos também aqui uma possível influência da presença de SFB e ausência do endossimbionte (curada) em *A. deanei*, a qual apresentou grandes quantidades de C17:0, tanto crescida na presença (32,23%) ou na ausência (33,25%) de SFB, curada (34,04%) e 17,85% numa concentração menor de parasitos ( $4 \times 10^7$  coanomastigotas/mL) (Tabela 2).

A presença de C18:3 foi detectada em todas análises de *A. deanei*, porém *T. cruzi* não apresentou tal ácido graxo. O cálculo de DBI foi feito para os ácidos graxos insaturados das diferentes amostras apresentou valores próximos para o clone DM28c controle (0,45) e tratado (0,43) enquanto entre as demais cepas/clones de *T. cruzi* Col17G2 (0,59) e Y (0,49) apresentaram o valor máximo e mínimo (Tabela 2). *A. deanei* curada mostrou um elevado DBI (0,73) quando comparada com *A. deanei* crescida na presença (0,35) ou ausência (0,41) de SFB, sendo este dado uma influência da maior porcentagem de C18:3 (11,87) e C18:1 (27,30) em *A. deanei* curada (Tabela 2). A maior e menor razão UFA/SFA foi observado no clone Col17G2 (0,83) e no clone DM28c (0,54) respectivamente. O tratamento com cetoconazol reduziu ainda mais esta razão em DM28c (0,48) e *A. deanei* curada apresentou a mais alta razão (0,80) entre as amostras de *A. deanei* analisadas (Tabela 2).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS (MEAG), DBI E RAZÃO DE UFA/SFA DOS EXTRATOS LIPÍDICOS DE *A. deanei* E CEPAS/CLONES DE *T. cruzi*.

| MEAG                          | C14:0 | C16:1 | C16:0 | C17:0 | C18:3 | C18:2 | C18:1 | C18:0 | C19* | DBI  | Razão UFA/SFA |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|---------------|
| DM28c                         | 3,57  | 3,30  | 29,26 | 1,50  | -     | 9,92  | 21,76 | 30,69 | -    | 0,45 | 0,54          |
| DM28c <sup>a</sup>            | 3,47  | 2,45  | 31,13 | 1,12  | -     | 10,74 | 19,28 | 31,82 | -    | 0,43 | 0,48          |
| CL Brener                     | 1,53  | 2,52  | 27,21 | 0,95  | -     | 10,66 | 29,13 | 28,01 | -    | 0,53 | 0,73          |
| G                             | 1,62  | 3,57  | 27,51 | 0,88  | -     | 13,25 | 24,51 | 28,68 | -    | 0,55 | 0,70          |
| Y                             | 2,54  | 5,07  | 31,28 | 1,01  | -     | 12,92 | 17,79 | 29,40 | -    | 0,49 | 0,56          |
| Sylvio                        | 2,94  | 3,81  | 26,28 | 0,72  | -     | 9,96  | 28,27 | 28,02 | -    | 0,52 | 0,73          |
| Col17G2                       | 1,94  | 3,21  | 24,82 | 0,76  | -     | 13,50 | 28,67 | 27,07 | -    | 0,59 | 0,83          |
| <i>A. deanei</i> <sup>b</sup> | 1,83  | 0,91  | 11,07 | 32,23 | 4,08  | 2,32  | 17,59 | 29,96 | 8,11 | 0,35 | 0,33          |
| <i>A. deanei</i> <sup>c</sup> | -     | -     | 14,94 | 17,85 | 7,28  | 3,07  | 24,21 | 32,65 | 2,95 | 0,52 | 0,53          |
| <i>A. deanei</i> <sup>d</sup> | 1,41  | -     | 11,35 | 33,25 | 5,79  | 2,97  | 17,32 | 27,91 | 6,61 | 0,41 | 0,35          |
| <i>A. deanei</i> <sup>e</sup> | -     | -     | 2,99  | 34,04 | 11,87 | 5,15  | 27,30 | 18,65 | 8,34 | 0,73 | 0,80          |

<sup>a</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 1 µM por 72h.

<sup>b</sup>- *A. deanei* crescida com 10% de SFB.

<sup>c</sup>- *A. deanei* crescida com 10% de SFB e concentração de  $4 \times 10^7$  coanomastigotas/mL.

<sup>d</sup>- *A. deanei* crescida na ausência de SFB.

<sup>e</sup>- *A. deanei* curada.

\*Ácido graxo ciclopropano C19 (*cis*-9,10-ácido metilenoctadecanóico).

Pela análise da composição de esteróis do clone DM28c de *T. cruzi* tratado com cetoconazol, pode-se observar o acúmulo de precursores da biosíntese de ergosterol (lanosterol e eburicol) e a total ausência de ergosterol, após o tratamento com diferentes concentrações da droga e tempo de exposição, mesmo na menor dose e tempo testados (Tabela 3 e Figura 16).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DE ESTERÓIS DO CLONE DM28c DE *T. cruzi* E *A. deanei*.

|                               | Esteróis (%) |       |      |       |       |      |      |       |
|-------------------------------|--------------|-------|------|-------|-------|------|------|-------|
|                               | I            | II    | III  | IV    | V     | VI   | VII  | VIII  |
| DM28c                         | 60,57        | 11,41 | 9,13 | 3,12  | 10,69 | -    | 5,08 | -     |
| DM28c <sup>a</sup>            | 69,68        | -     | -    | -     | -     | 4,79 | -    | 25,53 |
| DM28c <sup>b</sup>            | 43,21        | -     | -    | -     | -     | 9,46 | -    | 47,33 |
| DM28c <sup>c</sup>            | 48,38        | -     | -    | -     | -     | 5,37 | -    | 46,26 |
| <i>A. deanei</i> <sup>d</sup> | 7,85         | 87,03 | -    | -     | 3,22  | -    | 1,91 | -     |
| <i>A. deanei</i> <sup>e</sup> | -            | 93,95 | -    | -     | 6,05  | -    | -    | -     |
| <i>A. deanei</i> <sup>f</sup> | 11,41        | 67,52 | -    | 11,19 | 9,88  | -    | -    | -     |

I – colesterol; II – ergosterol; III – episterol; IV – fecosterol; V – 4-metil-ergosta-8,14,24-trienol; VI – lanosterol; VII – metil-episterol; VIII – eburicol.

- <sup>a</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 1µM por 24h.  
<sup>b</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 1µM por 72h.  
<sup>c</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 10µM por 72h.  
<sup>d</sup>- *A. deanei* crescida na presença de SFB.  
<sup>e</sup>- *A. deanei* crescida na ausência de SFB.  
<sup>f</sup>- *A. deanei* curada.

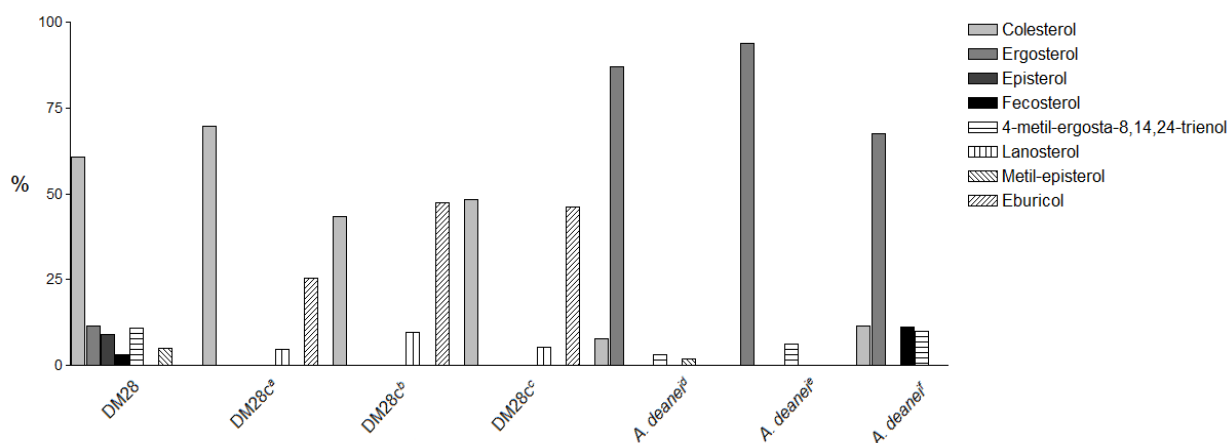


FIGURA 16 – GRÁFICO DE COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DE ESTERÓIS DO CLONE DM28c DE *T. cruzi* E *A. deanei*. Legenda: <sup>a</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 1µM por 24h. <sup>b</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 1µM por 72h. <sup>c</sup>- Clone DM28c tratado com cetoconazol, 10µM por 72h. <sup>d</sup>- *A. deanei* crescida na presença de SFB. <sup>e</sup>- *A. deanei* crescida na ausência de SFB. <sup>f</sup>- *A. deanei* curada.

## 7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, os perfis lipídicos foram analisados para se explorar as diferenças químicas entre 6 cepas/clones de *T. cruzi* (DM28c, CL Brener, G, Y, Col17G2 e Sylvio) pertencendo a 3 diferentes UTDs (*T. cruzi* I, II e VI). Também foram avaliados os efeitos da adição de cetoconazol (um inibidor da biossíntese de ergosterol) no perfil de um clone (DM28c) e fizemos, por fim, um estudo quimiométrico comparativo entre *T. cruzi* e o parasito não-infectivo à humanos, *A. deanei*, ambos pertencentes à família Trypanosomatidae.

A técnica de ressonância magnética nuclear tem sido usada em estudos de caracterização de variados tipos de compostos em microrganismos da família Trypanosomatidae. Como exemplos temos a verificação da morte celular através da análise de determinados lipídios de *T. cruzi* na forma epimastigota por RMN (BENITEZ *et al.*, 2012); caracterização de metabólitos de *T. cruzi* (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 1995) e *Crithidia luciliae* (GILROY *et al.*, 1988) por RMN de hidrogênio; análise do metabolismo de glucose em *Crithidia fasciculata* (DE LOS SANTOS *et al.*, 1985) e *T. cruzi* (FRYDMAN *et al.*, 1990) através de RMN de  $^{13}\text{C}$ ; análise dos produtos finais do metabolismo em *T. cruzi* por RMN de hidrogênio (PENIN, SANCHEZ-MORENO e DE DIEGO, 1998); caracterização estrutural de uma proteína ligante de cálcio em *Trypanosoma brucei* (XU *et al.*, 2012); RMN de  $^{31}\text{P}$  com alta resolução de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major* (MORENO *et al.*, 2000) e caracterização da resposta temporal multivariada em modelo animal infectado com *T. brucei brucei* por RMN de hidrogênio (WANG *et al.*, 2008).

A ACP foi uma das técnicas quimiométricas usada com sucesso para avaliar a relação genética e biológica entre 12 cepas de *T. cruzi* pertencendo a diferentes UTDs e provenientes de diferentes reservatórios (LALA *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que ACP também foi capaz de discriminar, com alta reprodutibilidade, os perfis lipídicos de 6 cepas/clones de *T. cruzi* pertencendo a 3 diferentes UTDs (*T. cruzi* I, II e VI) partindo-se dos dados de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Destaca-se, nesse caso, que a separação por ACP

ocorreu de maneira satisfatória mesmo em cepas/clones pertencentes à mesma UTD, como DM28c, Sylvio, G e Col17G2, as quais pertencem à UTD *T. cruzi* I. Tal fato indica uma variabilidade entre o perfil lipídico destas cepas/clones de mesmo grupo e ao observarmos a distribuição de seus *scores plot* respectivos (Figura 13B1) notamos que não estão próximos entre si, (principalmente entre G, Col17G2 e DM28c). Evidencia-se, ao contrário, uma aproximação entre CL Brener (*T. cruzi* VI) e G (*T. cruzi* I) as quais também neste caso se isolam das demais. Enfocando-se a região predominante de fosfolípidios (Figura 13C1), temos uma acentuada aproximação entre CL Brener (*T. cruzi* VI), G (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II), ao passo que DM28c (*T. cruzi* I) isola-se bastante. Um trabalho de Rodrigues *et al.* (2010) demonstrou que houve uma diferença significativa dos efeitos em hospedeiro quando camundongos eram infectados com o clone CL Brener e/ou a cepa JG (*T. cruzi* II) de *T. cruzi*. Verificou-se um reduzido parasitismo, baixa resposta imune e nenhuma manifestação clínica da doença quando a infecção se dava apenas com a cepa JG, os efeitos contrários quando ocorria infecção por CL Brener e um efeito intermediário no caso de co-infecção. Andrade *et al.* (2002) relata ainda a detecção apenas da cepa JG em tecido cardíaco de camundongo quando co-infectado com a cepa Colombiana (*T. cruzi* I). Tais trabalhos vêm destacar a importância que a população do parasito pode influenciar na infecção com *T. cruzi*. Os componentes diferenciais detectados na ACP realizada neste trabalho (ácido graxo C18:1, fosfatidilserina e colesterol) podem indicar um caminho a ser estudado para elucidar as diferenças também nas formas infectivas em humanos e uma provável relação dos lipídios encontrados com a sua função no processo infectivo, não havendo ainda trabalhos que esclareçam tais pontos. Já é sabido, no entanto, que a exposição de fosfatidilserina na superfície celular de formas tripomastigotas de *T. cruzi* está relacionada com mecanismos de evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro (DAMATTA *et al.*, 2007) podendo a variação deste fosfolípido entre as cepas/clones da forma epimastigota detectada neste trabalho, fornecer uma possível explicação para os diferentes comportamentos das cepas observados em modelo animal infectado.

Alguns fosfolipídios que influenciaram a diferenciação na ACP realizada em *T. cruzi* após o tratamento com cetoconazol já foram relatados em trabalho semelhante. Contreras *et al.* (1997) ao analisarem os efeitos do cetoconazol em epimastigotas de *T. cruzi* verificaram uma inversão nas porcentagens encontradas entre fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina após o tratamento, reduzindo a primeira e aumentando a segunda. O estudo sugere que um dos principais efeitos da depleção de esteróis endógenos induzida por inibidores é uma modificação da composição fosfolipídica como consequência da atividade reduzida da enzima PE-PC-n-metil transferase. Em nosso trabalho a ACP detectou Gly-C3(PC/PE) (4,01 ppm) como um sinal influente na diferenciação (Figura 15C2 e 15C3), e a análise das integrais de PC-1' e PE-2' acusou uma elevação de 4,5% na primeira e redução de 10,2% na segunda, comportando-se as porcentagens destes fosfolipídios de maneira inversa ao relatado no trabalho citado (Tabela 1). PI-6' foi o assinalamento de fosfolipídio que apresentou maior variação na área de integral, elevando-se em 18,9% e sendo também discriminado na ACP (Figura 15C2 e 15C3).

A composição de ácidos graxos de *T. cruzi* na forma epimastigota encontrada neste trabalho apresentou algumas diferenças em relação a outros. Kaneda *et al.* (1986) encontraram como principal ácido graxo também na forma epimastigota C18:2 (49%), porém na cepa Tulahuen, utilizando 5% de SFB e o mesmo meio usado em nosso trabalho, ao passo que nosso estudo mostrou uma média de 11,5% de C18:2 entre as cepas de *T. cruzi*, sendo C18:0, C18:1 e C16:0 os principais ácidos graxos (Tabela 2). Outro trabalho, detectou 24% de C18:2 e 23% de C14:0 em epimastigotas do clone DM28c de *T. cruzi* cultivado em mesmo meio, indicando que a composição de ácidos graxos tem diferido entre os estudos já feitos (ESTEVEZ *et al.*, 1989).

Os ácidos graxos encontrados em maior quantidade tanto em *A. deanei* crescida na ausência e presença de SFB foram C17:0 (33,25 e 32,23% respectivamente) e C18:0 (27,91 e 29,96% respectivamente), enquanto em *A. deanei* curada temos também C17:0 como o ácido graxo encontrado em maior porcentagem (34,04%) juntamente com C18:1 (27,30%). Meyer & Holz (1966) detectaram em *Crithidia fasciculata*, uma espécie próxima a *A. deanei*, que seus principais ácidos graxos são C18:1 (26%) e C18:3 (17%), destacando-se

neste estudo a presença de 7,1% do ácido graxo ciclopropano (AGC) C19 (*cis*-9,10-ácido metilenoctadecanóico) o qual também foi encontrado em nossas análises de *A. deanei* nas porcentagens de 8,11% quando crescida na presença de SFB, 6,61% na ausência de SFB e 8,34% quando curada (Tabela 2).

A presença de altas porcentagens de C17:0 ainda não havia sido relatada na família Trypanosomatidae, sendo pequenas quantidades deste ácido graxo encontradas em bactérias (O'LEARY W, 1962). Fish *et al.* (1981) fez um estudo a respeito da presença do ácido graxo ciclopropano C19 (*cis*-9,10-ácido metilenoctadecanóico) entre diversas espécies da família Trypanosomatidae e detectou a presença de 44% deste AGC na fração de fosfatidiletanolamina de *A. deanei*. De acordo com o mesmo estudo, esta presença não parece estar associada com o endossimbionte e isto foi confirmado por nosso trabalho, já que ele foi detectado em proporções similares em *A. deanei* com soro (8,11%), sem (6,11%) e curada (8,34%). Porém a porcentagem detectada em *A. deanei* crescida em baixa concentração de parasitos ( $4 \times 10^7$  coanomastigotas/mL) foi bem menor, apenas 2,95%, assim como a porcentagem de C17:0, que foi de 17,85% (Tabela 2). Alta porcentagem de um AGC C17 foi relatada na bactéria *Pseudomonas putida* durante sua fase estacionária de crescimento e não em sua fase logarítmica. Este AGC parece estabilizar os lipídios de membrana contra a degradação, podendo estar envolvidos também na tolerância ao estresse quando a bactéria alcança a fase estacionária (MACDONALD, SYKES e MCELHANEY, 1985; MUNOZ-ROJAS *et al.*, 2006). Esta hipótese da relação entre altas quantidades de AGC e a resistência ao estresse já foi testada na bactéria *E. coli* e verificou-se, porém, que os mutantes da enzima ciclopropano ácido graxo sintetase se comportaram da mesma maneira que a bactéria selvagem com relação à resistência ao estresse testado de várias maneiras, permanecendo incerta a função de tais ácidos graxos em bactérias e tripanossomatídeos (TAYLOR e CRONAN, 1976; FISH *et al.*, 1981). Podemos, no entanto, sugerir um possível envolvimento do AGC *cis*-9,10-ácido metilenoctadecanóico e também de C17:0 (apesar de não ser um AGC) na multiplicação e resistência do parasita, tendo

em vista suas reduções drásticas de percentual em fase logarítmica de crescimento.

A análise de esteróis em *T. cruzi*, demonstrou o efeito do inibidor da biossíntese de ergosterol (cetoconazol) utilizado em diferentes doses e tempos de exposição (Tabela 3). Ergosterol não foi detectado já a partir da dose de 1  $\mu\text{M}$  por 24h de tratamento (Tabela 3). Doyle *et al.* relataram resultados similares ao nosso quando formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com outro inibidor da mesma enzima (posaconazol), apresentando uma depleção total de ergosterol com 5  $\mu\text{M}$  da droga por 72h e acúmulo dos mesmos precursores eburicol (em maior proporção) e lanosterol.

Os assinalamentos do espectro de RMN em *T. cruzi* controle e tratado também confirmaram os efeitos do cetoconazol, ocorrendo depleção dos assinalamentos de ergosterol e acúmulo de eburicol (Figura 11A e 11B). Os esteróis de *A. deanei* crescida na ausência ou presença de SFB (Tabela 3) mostraram resultados semelhantes a Korn *et al.* (1969) que detectaram em *Crithidia fasciculata* principalmente ergosterol e uma pequena quantidade de colesterol quando crescida na presença de SFB. Diferentemente, um estudo de Palmie-Peixoto *et al.* (2006) analisou esteróis de *A. deanei* crescida com 10% de SFB e detectou somente ergosterol, não apresentando colesterol. *T. cruzi* e *A. deanei* não são capazes de sintetizar colesterol (LEPESHEVA, VILLALTA e WATERMAN, 2011) e uma captação deste do meio de cultura foi mais acentuada em *T. cruzi* que apresentou 60,57% de colesterol no controle, enquanto *A. deanei* apresentou 7,85% quando crescida com SFB e 11,41% para *A. deanei* curada (Tabela 3). De fato, formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de captar, armazenar e mobilizar colesterol de inclusões lipídicas no reservossomo de acordo com a porcentagem de SFB, entretanto as implicações celulares desta captação ainda são desconhecidas (PEREIRA *et al.*, 2011).

O pico mais acentuado de ergosterol C18 observado no experimento de RMN de  $^1\text{H}$  em *A. deanei* curada (Figura 11D) pode ser explicado pelas maiores quantidades de ácidos graxos insaturados encontrados nela (Tabela 2), o que pode significar uma compensação estrutural para manter o estado líquido-ordenado da membrana, já que uma maior quantidade de esteróis

diminui a fluidez da membrana e o aumento de ácido graxos insaturados tem efeito contrário (DUFOURC, 2008).

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho empreendeu a caracterização do perfil lipídico do parasito *T. cruzi* através de técnicas de RMN 1D, 2D e CG-EM e a diferenciação através de análise quimiométrica por componentes principais de 6 cepas/clones pertencentes a diferentes UTDs. Os principais componentes lipídicos nesta diferenciação foram o ácido graxo C18:1, fosfatidilserina e colesterol.

Foi realizado também um estudo dos efeitos de um inibidor da biossíntese de ergosterol (cetoconazol) no perfil lipídico do clone DM28c deste parasito, apresentando ergosterol, eburicol, colesterol, colesterol acetato, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, succinato e cistina como os componentes que mais influenciaram a diferenciação após o tratamento.

Uma análise comparativa entre *T. cruzi* e um parasito não infectivo a humanos, *A. deanei* foi feita revelando como principais elementos de diferenciação fosfatidilserina, ácidos graxos poliinsaturados (C18:2 e C18:3) e a presença de alta porcentagem de ácido graxo ímpar C17 em *A. deanei*. A análise comparativa realizada entre *A. deanei* crescida na ausência ou presença de soro fetal bovino e sem o endossimbionte (curada) teve como diferenças mais proeminentes ergosterol, fosfatidilserina e ácidos graxos insaturados (C18:1 e C18:3, que estiveram em alta porcentagem em *A. deanei* curada).

Um dado interessante proveniente da análise de *A. deanei* foi a presença em alta porcentagem e pela primeira vez relatada de ácido graxo C17 e a identificação de um ácido graxo ciclopropano C19 já relatado. A detecção de uma queda significativa na porcentagem destes ácidos graxos quando *A. deanei* foi crescida em uma menor concentração de parasitos, constitui-se também uma informação bastante relevante.

Este estudo apresentou uma correspondência alta de resultados entre as diferentes técnicas usadas para caracterização estrutural (RMN 1D e 2D e CG-EM) e a análise quimiométrica por componentes principais. Foi possível mostrar os compostos que mais contribuíram para diferenciação entre as diferentes classes lipídicas (e até mesmo alguns compostos não lipídicos).

Com os dados de RMN bidimensional e as informações obtidas da literatura, conseguimos assinalar a grande maioria dos picos obtidos do experimento de RMN 1D e confirmar as diferenças provenientes da análise de ACP, fornecendo assim um conjunto de dados bastante útil para identificação de lipídios encontrados numa amostra.

## 9 PERSPECTIVAS

Este foi um trabalho pioneiro, que empreendeu a união de técnicas analíticas buscando a sua aplicação na caracterização dos lipídios obtidos de diferentes cepas/clones de *T. cruzi* e do parasito infectivo de insetos *A. deanei*, (ambos pertencentes à família Trypanosomatidae) assim como a verificação dos efeitos de um inibidor da biossíntese de ergosterol em *T. cruzi*. Os resultados promissores abrem possibilidades para a continuação dos estudos e como sugestão de experimentos podemos citar: um estudo quantitativo mais aprofundado dos principais componentes diferenciados entre as cepas/clones de *T. cruzi* e os efeitos do tratamento com cetoconazol; um estudo lipidômico nos mesmos moldes deste trabalho com a forma infectiva em humanos de *T. cruzi* (tripomastigota metacíclica) para fins de comparação; verificação da possível função desempenhada pelos ácidos graxos C17 e C19 no crescimento de *A. deanei*.

## REFERÊNCIAS

ADOSRAKU, R. K.; CHOI, G. T.; CONSTANTINOU-KOKOTOS, V.; ANDERSON, M. M.; GIBBONS, W. A. NMR lipid profiles of cells, tissues, and body fluids: proton NMR analysis of human erythrocyte lipids. **J Lipid Res**, v. 35, n. 11, p. 1925-1931, 1994.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R.; FERGUSON, M. A.; TRAVASSOS, L. R. Trypanosoma cruzi mucins: potential functions of a complex structure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 173-6, 1999.

ANDRADE, L. O.; GALVAO, L. M.; MEIRELLES MDE, N.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue tropism of Trypanosoma cruzi strains: an in vitro study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 834-7, 2010.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice. **Mol Biochem Parasitol**, v. 100, n. 2, p. 163-72, 1999.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Trypanosoma cruzi: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp Parasitol**, v. 100, n. 4, p. 269-75, 2002.

ANÔNIMO. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 1, p. 133-8, 1998.

ARAUJO, M. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E.; BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother**, v. 45, n. 6, p. 819-24, 2000.

ASHTON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUNSTEIN, V. L.; DESRUISSEAU, M. S.; FACTOR, S. M.; LOPEZ, L.; BERMAN, J. W.; WITTNER, M.; SCHERER, P. E.; CAPRA, V.; COFFMAN, T. M.; SERHAN, C. N.; GOTLINGER, K.; WU, K. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ,

H. B. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 929-40, 2007.

BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B.; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. **J Lipid Res**, v. 48, n. 4, p. 837-47, 2007.

BEACH, D. H.; GOAD, L. J.; HOLZ, G. G., JR. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 136, n. 3, p. 851-6, 1986.

BECKONERT, O.; COEN, M.; KEUN, H. C.; WANG, Y.; EBBELS, T. M.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. **Nat Protoc**, v. 5, n. 6, p. 1019-1032, 2010.

BENITEZ, D.; PEZAROGLO, H.; MARTINEZ, V.; CASANOVA, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. Study of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 506-15, 2012.

BENTO, C. A.; MELO, M. B.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; PECANHA, L. M. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. **J Immunol**, v. 157, n. 11, p. 4996-5001, 1996.

BENVENISTE, P. Sterol biosynthesis. **Annual review of plant physiology**, v. 37, n. 1, p. 275-308, 1986.

BREEN, E. P.; GOUIN, S. G.; MURPHY, A. F.; HAINES, L. R.; JACKSON, A. M.; PEARSON, T. W.; MURPHY, P. V.; PORTER, R. K. On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function. **J Biol Chem**, v. 281, n. 4, p. 2114-9, 2006.

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

BRODSKY, C.; PATRICIO, J.; OLIVEIRA, R.; LOBO, L.; ARNHOLDT, A.; MENDONCA-PREVIATO, L.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3736-43, 2002.

BUCKNER, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. **Adv Exp Med Biol**, v. 625, p. 61-80, 2008.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infect**, v. 5, n. 5, p. 419-27, 2003.

CABRINI, L.; LANDI, L.; STEFANELLI, C.; BARZANTI, V.; SECHI, A. M. Extraction of lipids and lipophilic antioxidants from fish tissues: a comparison among different methods. **Comp Biochem Physiol B**, v. 101, n. 3, p. 383-6, 1992.

CAMARGO, M. M.; ALMEIDA, I. C.; PEREIRA, M. E.; FERGUSON, M. A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J Immunol**, v. 158, n. 12, p. 5890-901, 1997.

CARREIRA, J. C.; JONES, C.; WAIT, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Glycoconj J**, v. 13, n. 6, p. 955-66, 1996.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomed Environ Sci**, v. 1, n. 1, p. 19-33, 1988.

CASU, M.; ANDERSON, G. J.; CHOI, G.; GIBBONS, W. A. NMR lipid profiles of cells, tissues and body fluids. **Magn Reson Chem**, v. 29, p. 594-602, 1991.

CHOI, G. T.; CASU, M.; GIBBONS, W. A. N.m.r. lipid profiles of cells, tissues and body fluids. Neutral, non-acidic and acidic phospholipid analysis of Bond Elut chromatographic fractions. **Biochem J**, v. 290 ( Pt 3), p. 717-721, 1993.

CHRISTENSEN, S. A.; KOLOMIETS, M. V. The lipid language of plant-fungal interactions. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 1, p. 4-14, 2011.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S12-5, 2010.

COEN, M.; LENZ, E. M.; NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D.; POGNAN, F.; LINDON, J. C. An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. **Chem Res Toxicol**, v. 16, n. 3, p. 295-303, 2003.

CONTRERAS, L. M.; VIVAS, J.; URBINA, J. A. Altered lipid composition and enzyme activities of plasma membranes from *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 5, p. 697-704, 1997.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; DEOLINDO, P.; ARNHOLDT, A. C.; MANHAES, L.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS Microbiol Lett**, v. 266, n. 1, p. 29-33, 2007.

DE LEDERKREMER, R. M.; LIMA, C.; RAMIREZ, M. I.; FERGUSON, M. A.; HOMANS, S. W.; THOMAS-OATES, J. Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. **J Biol Chem**, v. 266, n. 35, p. 23670-5, 1991.

DE LOS SANTOS, C.; BULDAIN, G.; FRYDMAN, B.; CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-<sup>13</sup>C]glucose metabolism in *Crithidia fasciculata*. Evidence of CO<sub>2</sub> fixation by phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Eur J Biochem**, v. 149, n. 2, p. 421-9, 1985.

DIXON, J. B. The effect of obesity on health outcomes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 104-8, 2010.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 251-61, 2005.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; TURRENS, J. F.; KATZIN, A. M.; GONZALEZ-CAPPA, S. M.; STOPPANI, A. O. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 3, n. 3, p. 169-80, 1981.

DOYLE, P. S.; CHEN, C. K.; JOHNSTON, J. B.; HOPKINS, S. D.; LEUNG, S. S.; JACOBSON, M. P.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; PODUST, L. M. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 6, p. 2480-8, 2010.

DUARTE, I. F.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; PARKER, D. A.; SWANN, J. R.; SPRAUL, M.; BRAUMANN, U.; GIL, A. M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; MURPHY, G. M.; VILCA-MELENDZ, H.; HEATON, N.; LINDON, J. C. Identification of metabolites in human hepatic bile using 800 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, HPLC-NMR/MS and UPLC-MS. **Mol Biosyst**, v. 5, n. 2, p. 180-90, 2009.

DUFOURC, E. Sterols and membrane dynamics. **Journal of Chemical Biology**, v. 1, n. 1-4, p. 63-77, 2008.

ESTEVEZ, M. G.; GONZALES-PERDOMO, M.; ALVIANO, C. S.; ANGLUSTER, J.; GOLDENBERG, S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 50, n. 1-2, p. 31-4, 1989.

FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 352, n. 1359, p. 1295-302, 1997.

FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; GERALDO YONEYAMA, K. A.; STRAUS, A. H.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 13, p. 1431-41, 2007.

FISH, W. R.; HOLZ, G. G., JR.; BEACH, D. H.; OWEN, E.; ANEKWE, G. E. The cyclopropane fatty acid of trypanosomatids. **Mol Biochem Parasitol**, v. 3, n. 2, p. 103-15, 1981.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRYDMAN, B.; DE LOS SANTOS, C.; CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [ $^{13}\text{C}$ ]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two  $\text{CO}_2$  fixation reactions. **Eur J Biochem**, v. 192, n. 2, p. 363-8, 1990.

GAZZINELLI, R. T.; CAMARGO, M. M.; ALMEIDA, I. C.; MORITA, Y. S.; GIRALDO, M.; ACOSTA-SERRANO, A.; HIENY, S.; ENGLUND, P. T.; FERGUSON, M. A.; TRAVASSOS, L. R.; SHER, A. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. **Chem Immunol**, v. 68, p. 136-52, 1997.

GILROY, F. V.; EDWARDS, M. R.; NORTON, R. S.; O'SULLIVAN, W. J. Metabolic studies of the protozoan parasite, *Crithidia luciliae*, using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Mol Biochem Parasitol**, v. 31, n. 2, p. 107-15, 1988.

GIMENEZ, G.; MAGALHAES, K. G.; BELAUNZARAN, M. L.; PONCINI, C. V.; LAMMEL, E. M.; GONZALEZ CAPPA, S. M.; BOZZA, P. T.; ISOLA, E. L. Lipids from attenuated and virulent *Babesia bovis* strains induce differential TLR2-mediated macrophage activation. **Mol Immunol**, v. 47, n. 4, p. 747-55, 2010.

GOMES, N. A.; PREVIATO, J. O.; ZINGALES, B.; MENDONCA-PREVIATO, L.; DOSREIS, G. A. Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. **J Immunol**, v. 156, n. 2, p. 628-35, 1996.

GROSS, R. W.; HAN, X. Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology. **Chem Biol**, v. 18, n. 3, p. 284-91, 2011.

HAINES, T. H. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? **Prog Lipid Res**, v. 40, n. 4, p. 299-324, 2001.

KANEDA, Y.; NAGAKURA, K.; GOUTSU, T. Lipid composition of three morphological stages of *Trypanosoma cruzi*. **Comp Biochem Physiol B**, v. 83, n. 3, p. 533-6, 1986.

KLOSE, C.; EJSING, C. S.; GARCÍA-SÁEZ, A. J.; KAISER, H.-J.; SAMPAIO, J. L.; SURMA, M. A.; SHEVCHENKO, A.; SCHWILLE, P.; SIMONS, K. Yeast Lipids Can Phase-separate into Micrometer-scale Membrane Domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 30224-30232, 2010.

KORN, E. D.; VON BRAND, T.; TOBIE, E. J. The sterols of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. **Comp Biochem Physiol**, v. 30, n. 4, p. 601-10, 1969.

LALA, E. R.; ANDO, M. H.; ZALLOUM, L.; BERTOLI, M.; DE OLIVEIRA MACHADO DALALIO, M.; SILVEIRA, T. G.; GOMES, M. L.; GUEDES, T. A.; DE ARAUJO, S. M. *Trypanosoma cruzi*: Different methods of data analysis to evaluate the genetics-biology relationship. **Exp Parasitol**, v. 123, n. 2, p. 173-81, 2009.

LAYRE, E.; MOODY, D. B. Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens. **Biochimie**, v. 95, n. 1, p. 109-15, 2013.

LEPESHEVA, G. I.; PARK, H. W.; HARGROVE, T. Y.; VANHOLLEBEKE, B.; WAWRZAK, Z.; HARP, J. M.; SUNDARAMOORTHY, M.; NES, W. D.; PAYS, E.; CHAUDHURI, M.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14 $\alpha$ -demethylase and implications for selective treatment of human infections. **J Biol Chem**, v. 285, n. 3, p. 1773-80, 2010.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51). **Adv Parasitol**, v. 75, p. 65-87, 2011.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, n. 3, p. 467-77, 2007.

LEPESHEVA, G. I.; ZAITSEVA, N. G.; NES, W. D.; ZHOU, W.; ARASE, M.; LIU, J.; HILL, G. C.; WATERMAN, M. R. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 $\alpha$ -demethylase. **J Biol Chem**, v. 281, n. 6, p. 3577-85, 2006.

LIN, J. H.; LIU, L. Y.; YANG, M. H.; LEE, M. H. Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to folch reagent for extracting animal lipids. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 16, p. 4984-4986, 2004.

LIU, Y.; CHEN, Y.; MOMIN, A.; SHANER, R.; WANG, E.; BOWEN, N. J.; MATYUNINA, L. V.; WALKER, L. D.; MCDONALD, J. F.; SULLARDS, M. C.; MERRILL, A. H., JR. Elevation of sulfatides in ovarian cancer: an integrated transcriptomic and lipidomic analysis including tissue-imaging mass spectrometry. **Mol Cancer**, v. 9, p. 186, 2010.

MACDONALD, P. M.; SYKES, B. D.; MCELHANEY, R. N. Fluorine-19 nuclear magnetic resonance studies of lipid fatty acyl chain order and dynamics in *Acholeplasma laidlawii* B membranes. A direct comparison of the effects of cis and trans cyclopropane ring and double-bond substituents on orientational order. **Biochemistry**, v. 24, n. 17, p. 4651-9, 1985.

MANCUSO, D. J.; KOTZBAUER, P.; WOZNIAK, D. F.; SIMS, H. F.; JENKINS, C. M.; GUAN, S.; HAN, X.; YANG, K.; SUN, G.; MALIK, I.; CONYERS, S.; GREEN, K. G.; SCHMIDT, R. E.; GROSS, R. W. Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2 $\{\gamma\}$  leads to alterations in hippocampal cardiolipin content and molecular species distribution, mitochondrial degeneration, autophagy, and cognitive dysfunction. **J Biol Chem**, v. 284, n. 51, p. 35632-44, 2009.

MANOEL-CAETANO, F. D. S.; SILVA, A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 2263-2274, 2007.

MEYER, H.; HOLZ, G. G., JR. Biosynthesis of lipids by kinetoplastid flagellates. **J Biol Chem**, v. 241, n. 21, p. 5000-7, 1966.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J. P.; CHATTERJEE, V. K.; GLASS, C. K.; GONZALEZ, F. J.; GRIMALDI, P. A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M. A.; O'RAHILLY, S.; PALMER, C. N.; PLUTZKY, J.; REDDY, J. K.; SPIEGELMAN, B. M.; STAELS, B.; WAHLI, W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 4, p. 726-41, 2006.

MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 1, p. 150-5, 2000.

MORENO, B.; URBINA, J. A.; OLDFIELD, E.; BAILEY, B. N.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates. **J Biol Chem**, v. 275, n. 37, p. 28356-62, 2000.

MOTTA, M. C.; CATTAPRETA, C. M.; SCHENKMAN, S.; DE AZEVEDO MARTINS, A. C.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; ELIAS, M. C. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12415, 2010.

MUNDIM, M. H.; ROITMAN, I. Extra Nutritional Requirements of Artificially Aposymbiotic *Crithidia deanei*\*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 329-331, 1977.

MUNOZ-ROJAS, J.; BERNAL, P.; DUQUE, E.; GODOY, P.; SEGURA, A.; RAMOS, J. L. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 1, p. 472-7, 2006.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2006.

NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. São Paulo: Atheneu, 2005.

NOGUEIRA, N. F.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; NOHARA, L. L.; ALMEIDA, I. C.; ZINGALES, B.; COLLI, W. Trypanosoma cruzi: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 2, p. 120-8, 2007.

NOMURA, D. K.; LONG, J. Z.; NIESSEN, S.; HOOVER, H. S.; NG, S. W.; CRAVATT, B. F. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. **Cell**, v. 140, n. 1, p. 49-61, 2010.

O'LEARY W, M. The Fatty Acids of Bacteria. **Bacteriol Rev**, v. 26, n. 4, p. 421-47, 1962.

OUDEJANS, R. C.; VAN DER HORST, D. J.; VAN DONGEN, J. P. Isolation and identification of cyclopropane fatty acids from the millipede Graphidostreptus tumuliporus (Karsch) (Myriapoda:Diplopoda). **Biochemistry**, v. 10, n. 26, p. 4938-41, 1971.

PALMIE-PEIXOTO, I. V.; ROCHA, M. R.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W.; EINICKER-LAMAS, M.; MOTTA, M. C. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids. **FEMS Microbiol Lett**, v. 255, n. 1, p. 33-42, 2006.

PENIN, P.; SANCHEZ-MORENO, M.; DE DIEGO, J. A. Proton nuclear magnetic resonance analysis of metabolic end products of the Bolivia strain of Trypanosoma cruzi and three of its clones. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 120, n. 4, p. 571-4, 1998.

PEREIRA, M. G.; NAKAYASU, E. S.; SANT'ANNA, C.; DE CICCO, N. N.; ATELLA, G. C.; DE SOUZA, W.; ALMEIDA, I. C.; CUNHA-E-SILVA, N. Trypanosoma cruzi epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22359, 2011.

PORTER, F. D.; SCHERRER, D. E.; LANIER, M. H.; LANGMADE, S. J.; MOLUGU, V.; GALE, S. E.; OLZESKI, D.; SIDHU, R.; DIETZEN, D. J.; FU, R.; WASSIF, C. A.; YANJANIN, N. M.; MARSO, S. P.; HOUSE, J.; VITE, C.;

SCHAFFER, J. E.; ORY, D. S. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 56, p. 56ra81, 2010.

PREVIATO, J. O.; WAIT, R.; JONES, C.; MENDONCA-PREVIATO, L. Structural analysis of novel rhamnose-branched oligosaccharides from the glycoposphosphingolipids of *Leptomonas samueli*. **Glycoconj J**, v. 11, n. 1, p. 23-33, 1994.

PRIOTTO, S.; SARTORI, M. J.; REPOSSI, G.; VALENTICH, M. A. Trypanosoma cruzi: participation of cholesterol and placental alkaline phosphatase in the host cell invasion. **Exp Parasitol**, v. 122, n. 1, p. 70-3, 2009.

RAWAT, S. S.; JOHNSON, B. T.; PURI, A. Sphingolipids: modulators of HIV-1 infection and pathogenesis. **Biosci Rep**, v. 25, n. 5-6, p. 329-43, 2005.

RODRIGUES, C. M.; VALADARES, H. M.; FRANCISCO, A. F.; ARANTES, J. M.; CAMPOS, C. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAUJO, M. S.; ARANTES, R. M.; CHIARI, E.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D.; FARIA, A. M.; MACEDO, A. M. Coinfection with different Trypanosoma cruzi strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 10, p. e846, 2010.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. São Paulo: Manole, 2003.

SALVATELLA, R. **Estimacion cuantitativa de La enfermedad de chagas en las Americas**. Organización Panamericana de la Salud. Montevideo. 2006

SANCHEZ-MORENO, M.; FERNANDEZ-BECERRA, M. C.; CASTILLA-CALVENTE, J. J.; OSUNA, A. Metabolic studies by <sup>1</sup>H NMR of different forms of Trypanosoma cruzi as obtained by 'in vitro' culture. **FEMS Microbiol Lett**, v. 133, n. 1-2, p. 119-25, 1995.

SASSAKI, G. L.; RITER, D. S.; SANTANA FILHO, A. P.; GUERRINI, M.; LIMA, M. A.; COSENTINO, C.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; RUDD, T. R.; NADER, H. B.; YATES, E. A.; GORIN, P. A.; TORRI, G.; IACOMINI, M. A robust method to quantify low molecular weight contaminants in heparin: detection of tris(2-n-butoxyethyl) phosphate. **Analyst**, v. 136, n. 11, p. 2330-8, 2011.

SCHALLER, H. The role of sterols in plant growth and development. **Prog Lipid Res**, v. 42, n. 3, p. 163-75, 2003.

SCHMIDT, D.; MACKINNON, R. Voltage-dependent K<sup>+</sup> channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 49, p. 19276-81, 2008.

SCHROEPFER, G. J., JR. Sterol biosynthesis. **Annu Rev Biochem**, v. 50, p. 585-621, 1981.

SERRANO, A. A.; SCHENKMAN, S.; YOSHIDA, N.; MEHLERT, A.; RICHARDSON, J. M.; FERGUSON, M. A. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 27244-53, 1995.

SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 424-30, 2006.

SHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 593-8, 2010.

SKOCZOWSKI, A.; FILEK, M.; DUBERT, F. The long-term effect of cold on the metabolism of winter wheat seedlings. II. composition of fatty acids of phospholipids. **Journal of Thermal Biology**, v. 19, n. 3, p. 171-176, 1994.

SKOURA, A.; HLA, T. Lysophospholipid receptors in vertebrate development, physiology, and pathology. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S293-8, 2009.

TAYLOR, F.; CRONAN, J. E., JR. Selection and properties of *Escherichia coli* mutants defective in the synthesis of cyclopropane fatty acids. **J Bacteriol**, v. 125, n. 2, p. 518-23, 1976.

TEIXEIRA, M. M.; BORGHEAN, T. C.; FERREIRA, R. C.; SANTOS, M. A.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; MILDER, R. V.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**, v. 162, n. 3, p. 503-24, 2011.

UNGER, R. H. Lipotoxic diseases. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 319-36, 2002.

UNGER, R. H.; CLARK, G. O.; SCHERER, P. E.; ORCI, L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 209-14, 2010.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 311-8, 2009.

URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 32, n. 8, p. 1237-42, 1988.

URBINA, J. A.; LIRA, R.; VISBAL, G.; BARTROLI, J. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 9, p. 2498-502, 2000.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L. M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 7, p. 1771-7, 1998.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. **Science**, v. 273, n. 5277, p. 969-71, 1996.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **Int J Antimicrob Agents**, v. 21, n. 1, p. 39-48, 2003.

VAN MEER, G. Cellular lipidomics. **EMBO J**, v. 24, n. 18, p. 3159-3165, 2005.

VAN MEER, G.; LEEFLANG, B. R.; LIEBISCH, G.; SCHMITZ, G.; GOÑI, F. M. The European lipidomics initiative: enabling technologies. **Methods Enzymol**, v. 432, p. 213-32, 2007.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 713687, 2012.

VEGIOPOULOS, A.; MULLER-DECKER, K.; STRZODA, D.; SCHMITT, I.; CHICHELNITSKIY, E.; OSTERTAG, A.; BERRIEL DIAZ, M.; ROZMAN, J.; HRABE DE ANGELIS, M.; NUSING, R. M.; MEYER, C. W.; WAHLI, W.; KLINGENSPOR, M.; HERZIG, S. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1158-61, 2010.

VIAL, H. J.; ELDIN, P.; TIELENS, A. G.; VAN HELLEMOND, J. J. Phospholipids in parasitic protozoa. **Mol Biochem Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 143-54, 2003.

VOLKMAN, J. K. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. **Organic Geochemistry**, v. 36, n. 2, p. 139-159, 2005.

WANG, Y.; UTZINGER, J.; SARIC, J.; LI, J. V.; BURCKHARDT, J.; DIRNHOFER, S.; NICHOLSON, J. K.; SINGER, B. H.; BRUN, R.; HOLMES, E. Global metabolic responses of mice to *Trypanosoma brucei brucei* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 16, p. 6127-32, 2008.

WENK, M. R. Lipidomics: new tools and applications. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 888-95, 2010.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). **Wkly Epidemiol Rec**, v. 85, n. 34, p. 334-336, 2010.

WILLKER, W.; LEIBFRITZ, D. Assignment of mono- and polyunsaturated fatty acids in lipids of tissues and body fluids. **Magn Reson Chem**, v. 36, p. 79-84, 1998.

WOLF, R. A.; GROSS, R. W. Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A2 in canine myocardium. **J Biol Chem**, v. 260, n. 12, p. 7295-303, 1985.

WOOD, R.; REISER, R. Cyclopropane Fatty Acid Metabolism: Physical and Chemical Identification of Propane Ring Metabolic Products in the Adipose Tissue. **J Am Oil Chem Soc**, v. 42, p. 315-20, 1965.

XU, X.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M.; AMES, J. B. NMR structure of the calflagin Tb24 flagellar calcium binding protein of *Trypanosoma brucei*. **Protein Sci**, v. 21, n. 12, p. 1942-7, 2012.

ZHANG, M.; MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. **J Biol Chem**, v. 277, n. 46, p. 43553-6, 2002.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, 2009.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 159-64, 1999.