

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
INSTITUTO BIOMÉDICO (IB)
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JULIANA MAGALHÃES CHAVES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS DO
PROTÓTIPO PIRIDÍNICO COM A SUBUNIDADE 1,3,4-TIADIAZÓLICA DO
MEGAZOL SOBRE O *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**

RIO DE JANEIRO/RJ

2018

JULIANA MAGALHÃES CHAVES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS DO
PROTÓTIPO PIRIDÍNICO COM A SUBUNIDADE 1,3,4-TIADIAZÓLICA DO
MEGAZOL SOBRE O *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do grau de bacharel.

Orientadora: Dra. Kelly Salomão

Co-orientadora: Dr. Marcello Xavier Sampaio

RIO DE JANEIRO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Magalhães Chaves Barbosa, Juliana

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS DO PROTÓTIPO PIRIDÍNICO COM A SUBUNIDADE 1,3,4-TIADIAZÓLICA DO MEGAZOL SOBRE O *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909 /

Juliana Magalhães Chaves Barbosa – Rio de Janeiro: 2018.

Orientadora: Kelly Salomão Salem

Coorientador: Marcello Xavier Sampaio

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) –

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,

Graduação em Biomedicina, 2018.

1. Doença de Chagas

2. *Trypanosoma cruzi*

3. Quimioterapia

4. Inibidores da biossíntese de ergosterol

5. Nitroimidazóis

JULIANA MAGALHÃES CHAVES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS DO
PROTÓTIPO PIRIDÍNICO COM A SUBUNIDADE 1,3,4-TIADIAZÓLICA DO
MEGAZOL SOBRE O *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Biomedicina da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro, como
requisito para a obtenção do grau de
bacharel.

Aprovada em de de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcello Xavier Sampaio - UNIRIO

Dra. Tatiana Galvão de Melo - FIOCRUZ

Dra. Kelly Salomão Salem - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e avós, Ecy e Péricles; agradeço por todo amor e apoio que recebo e pela dedicação em oferecer sempre o melhor possível à criação do meu irmão e a minha.

As minhas orientadoras, Dras. Kelly Salomão Salem e Solange Lisboa de Castro, meu muito obrigado pelo carinho, paciência e disponibilidade em me ensinar e colaborar para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

A todos os membros da sala 70, que sempre foram muito generosos em contribuir para minha formação. Especialmente, agradeço a Yasmin Pedra, a Ana Cristina Bombaça e ao Renan Pazini pelos conselhos valiosos, pelas fofquinhas e por tornarem meus dias mais divertidos.

Às minhas amigas da UNIRIO: Geyzzara Diniz, Gisele Souza, Raquel Gorrera e Yara Dabdab, pelas muitas risadas, assinaturas perfeitas e escalas de faltas. Agradeço em especial a minha “personal life”, Jéssica Blanco e ao meu companheiro de estudo de última hora, Rodrigo Pimentel, pelo carinho, companheirismo e por esses quatro anos me incentivando a ser uma pessoa melhor.

Agradeço também ao professor Marcello Sampaio, pelo aprendizado ao longo da faculdade e pela ajuda na conclusão desse trabalho.

Por fim, agradeço à UNIRIO, a Fiocruz e as agencias de fomento, FAPERJ e CNPq, que possibilitaram a realização desse trabalho.

“Hakuna Matata”
(The Lion King)

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença infecto parasitária, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, que segundo a OMS, acomete cerca de 8 milhões de pessoas. O tratamento atual é restrito ao Benznidazol (**Bz**) e ao Nifurtimox (**Nif**) e possui limitações que dificultam a realização de um tratamento adequado dos pacientes, como: os efeitos colaterais, os longos períodos de tratamento, a variação da eficácia de acordo com a fase da doença e a existência de cepas resistentes ao tratamento. Devido às dificuldades encontradas no tratamento atual, esforços contínuos têm sido realizados na procura por novas drogas, e neste contexto, diferentes compostos estão sendo testados pelo nosso grupo, dentre os quais se destacam: inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs) e nitroimidazóis. No presente estudo, determinamos a atividade tripanocida de compostos híbridos, do protótipo piridínico com a subunidade 1,3,4-tiadiazólica do megalozol. O efeito desses compostos foi avaliado sobre formas tripomastigotas da cepa Y e amastigotas intracelulares, das cepas Y e Tulahuen. Dentre os compostos híbridos testados sobre tripomastigotas, 7 apresentaram excelente atividade sendo mais ativos que as drogas IBEs de referência: **cetoconazol (Cz)** e **posaconazol (Pz)**. Os compostos **2035** e **2035HCl** foram os mais ativos contra tripomastigotas da cepa Y, porém o mais seletivo foi **1947HCl**, que apresentou boa atividade sobre o parasito e baixa toxicidade sobre macrófagos e cardiomiócitos. Por tal razão, o mesmo foi selecionado para os ensaios de atividade sobre as formas amastigotas intracelulares e para a avaliação do mecanismo de ação sobre tripomastigotas sanguíneos. Já nos ensaios com a cepa Tulahuen, os compostos **2033** e **2035** foram os mais ativos sobre o parasito. Resultados preliminares com amastigotas intracelulares (cepa Y) sugerem que o tratamento por 24 e 48h de culturas primárias de células cardíacas, infectadas, com o composto **1947HCl**, diminui a infecção, avaliada pelo índice endocítico. Para a investigação do mecanismo de ação de **1947HCl** analisamos por citometria: a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a integridade de membrana plasmática e o potencial de ação mitocondrial dos parasitos tratados; além da análise ultraestrutural por microscopia eletrônica. Curiosamente, não houve redução no potencial de ação mitocondrial; geração de ROS ou perda de integridade de membrana dos parasitos tratados com **1947HCl**, sugerindo que o modo de ação não

devem estar relacionados com a geração de ROS e a inibição de CYP51. Os compostos **2033** e **2035** foram os mais ativos sobre a cepa Y Tulahuen.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, quimioterapia, inibidores da biossíntese de ergosterol, nitroimidazóis.

ABSTRACT

Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affecting approximately eight million individuals. Treatment is restricted to benznidazole (**Bz**) and Nifurtimox (**Nif**) and is not satisfactory, showing poor activity in the late chronic phase, severe collateral effects and limited efficacy against different parasitic isolates. Therefore there is an intense effort to find new drugs for treatment of this disease. In this context inhibitors of ergosterol biosynthesis (IBEs) and nitroimidazoles have been investigated. The present study aimed to perform a trypanocidal activity of hybrid compounds of the prototype pyridine (IBE) with a 1,3,4-thiadiazolic subunit of the megalazole. The effect of these compounds was evaluated on intracellular trypomastigotes and amastigotes of the Y and Tulahuen strains. Among the drugs tested on trypomastigotes, of the Y strain, 7 were most active than IBEs of reference: **ketoconazole** and **posaconazole**. The compounds **2035** and **2035HCl** were the most effective against trypomastigotes of strain Y, but the most selective was **1947HCl**, presenting low toxicity on macrophages and cardiomyocytes. For this reason, it was selected for the activity assays on intracellular amastigote forms and for evaluation of the mechanism of action on trypomastigotes. Preliminary results of intracellular amastigote (Y strain) suggest that in 24 and 48 hs of treatment with **1947HCl** there is a decrease in the infection (monitored by the endocytic index). For the investigation of its mode of action, we analyzed by cytometry: the generation of reactive species of oxygen (ROS), the integrity of the plasma membrane and mitochondrial membrane potential. We also analyzed the ultrastructure of trypomastigotes treated with **1947HCl** by electron microscopy. Interestingly, there was no reduction in mitochondrial membrane potential; generation of ROS or loss of membrane integrity of parasites treated with **1947HCl**, suggesting that the mode of action should not be related to these factors. Finally, so far the compounds **2033** and **2035** were the most active in the Tulahuen strain.

Keywords: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, chemotherapy, inhibitors of ergosterol biosynthesis and nitroimidazoles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemiologia da doença de Chagas	15
Figura 2: Representação esquemática de epimastigota do <i>T. cruzi</i>	18
Figura 3: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 4: Cardiomiopatia chagásica.....	21
Figura 5: Estrutura química do Bz e Nif	23
Figura 6: Planejamento estrutural dos compostos híbridos.....	28
Figura 7: Estrutura química das moléculas mais ativas.....	37
Figura 8: Estrutura química do composto 1947 e 1947HCl	37
Figura 9: Estrutura química dos compostos menos ativos.....	38
Figura 10: Dados preliminares do IE.....	39
Figura 11: Marcação de PI.....	40
Figura 12: Marcação de DHE.....	40
Figura 13: Marcação de TMRE.....	41
Figura 14: Análise ultraestrutural (MET)	42
Figura 15: Análise ultraestrutural (MET)	43
Figura 16: Análise ultraestrutural (MEV)	43
Figura 17: Estrutura química do composto 2033 e 2035	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Atividade dos compostos híbridos sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) e citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais	36
Quadro 2: Citotoxicidade dos compostos 2035 e 1947HCl sobre culturas primárias de células cardíacas	38
Quadro 3: Efeito dos compostos híbridos sobre tripomastigotas e amastigotas da cepa Tulahuen de <i>T. cruzi</i>	45

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP - Adenosina trifosfato
BENEFIT - Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
Bz - Benznidazol
CPRG - Chlorophenolred- β -D-galactopyranoside
Cz - Cetoconazol
DC – Doença de Chagas
DHE - Dihidroetídio
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DNDi - Drugs for Neglected Diseases initiative
DTU – Unidades de tipificação distintas
ECG - Eletrocardiograma
FCCP - Carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
IBE – Inibidor da biossíntese de ergosterol
IC₅₀ – Concentração inibitória
IE – Índice endocítico
IS – Índice de seletividade
kDNA - DNA de cinetoplasto
LC₅₀ - Dose letal
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
Mg - Megazol
Nif - Nifurtimox
PI - Iodeto de Propídio
Pz - Posaconazol
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TMRE - Metil éster de tetrametilrodamina
 $\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 História e panorama atual da doença de Chagas	14
1.2 Vias de transmissão.....	16
1.3 O parasito e seu ciclo biológico.....	17
1.4 Patologia da doença.....	20
1.5 Diagnóstico e Tratamento da DC	22
1.6 Compostos testados.....	25
1.6.1 Inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs)	25
1.6.2 Nitroimidazóis	26
1.7 Objetivos	27
1.7.1 Geral.....	27
1.7.2 Específicos	27
2. DESENVOLVIMENTO	28
2.1 Metodologia.....	28
2.1.1 Síntese dos compostos	28
2.1.2 Parasitos.....	29
2.1.3 Avaliação do efeito dos compostos sobre <i>T. cruzi</i> da cepa Y.....	29
2.1.4 Avaliação do efeito dos compostos sobre <i>T. cruzi</i> da cepa Tulahuen ...	30
2.1.5 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> sobre células de mamíferos.....	30
2.1.6 Análise dos parasitos tratados por citometria de fluxo.....	31
2.1.7 Análise dos parasitos por microscopia eletrônica de transmissão.....	32
2.1.8 Análise dos parasitos por microscopia eletrônica de varredura.....	33
2.2 Resultado e Discussão.....	34
3. CONCLUSÕES	46
4. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 História e panorama atual da doença de Chagas

Em 1908, durante uma expedição para combater a malária, no norte de Minas Gerais, Carlos Chagas identificou pela primeira vez, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que mais tarde seria descrito como o agente etiológico da doença de Chagas (DC), assim nomeada em homenagem a esse pesquisador (CHAGAS, 1909). Desta forma, Carlos Chagas descreveu o patógeno, seus vetores e hospedeiros, sintomatologia clínica, espécies reservatórias e a epidemiologia dessa enfermidade (GURGEL *et al.*, 2009).

Atualmente, segundo a OMS, a DC acomete cerca de 8 milhões de pessoas em 21 países da América Latina e estima-se que essa doença leve a óbito mais de 10.000 pessoas por ano (WHO, 2018). Nesses países a DC é a maior causa de cardiomiopatia e a principal responsável por morte em pacientes com doenças cardiovasculares com idade entre 30-50 anos (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2009). Nas últimas décadas a DC passou a ser considerada um problema de saúde a nível mundial (**Figura 1**), visto que os movimentos populacionais aumentaram o potencial de dispersão da doença para países não endêmicos onde não era feita a triagem em bancos de sangue, elevando o risco de transmissão transfusional, congênita e por transplantes de órgãos (SCHMUNIS; YADON, 2010; COURA; VIÑAS, 2010; HOTEZ *et al.*, 2013).

Apesar de ainda ser uma doença de grande impacto, principalmente na América Latina, o programa de controle da DC, iniciado em 1991 nos países do Cone Sul, foi bem sucedido reduzindo a incidência da doença na região; sendo a transmissão vetorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans* interrompida no Uruguai em 1997 e no Chile em 1999 (SALVATELLA, 2007). Em 2006, a Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul contra a DC, declarou o Brasil livre da transmissão desta doença pelo *T. infestans* (KLUG, 1834). Porém, outros triatomíneos considerados vetores secundários, como o *T. sordidae* (STAL, 1859) e o *P. megistus* (Burmeister, 1835) ainda são encontrados no ambiente domiciliar (revisado em DIAS, 2006; STEVERDING, 2014).

No entanto, em alguns países da América Latina, como na Bolívia e México, as taxas de infecção humana por *T. cruzi* ainda são altas. Apesar dos avanços

alcançados no controle da doença na América do Sul, está ainda representa um sério desafio (a) pela sua peculiar epidemiologia, caracterizada pela diversidade de situações de risco (grande número de vetores e reservatórios potenciais, variadas formas de infecção e diferentes estoques do parasito que circulam no ambiente domiciliar, peridomiciliar e silvestre), (b) por não dispor de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos mais eficientes, principalmente para a fase crônica, menos tóxicos e de baixo custo, (c) pela falta de um entendimento mais completo da fisiopatologia da evolução da doença crônica; e (d) a necessidade de novos e efetivos métodos de diagnósticos (COURA; DIAS, 2009).

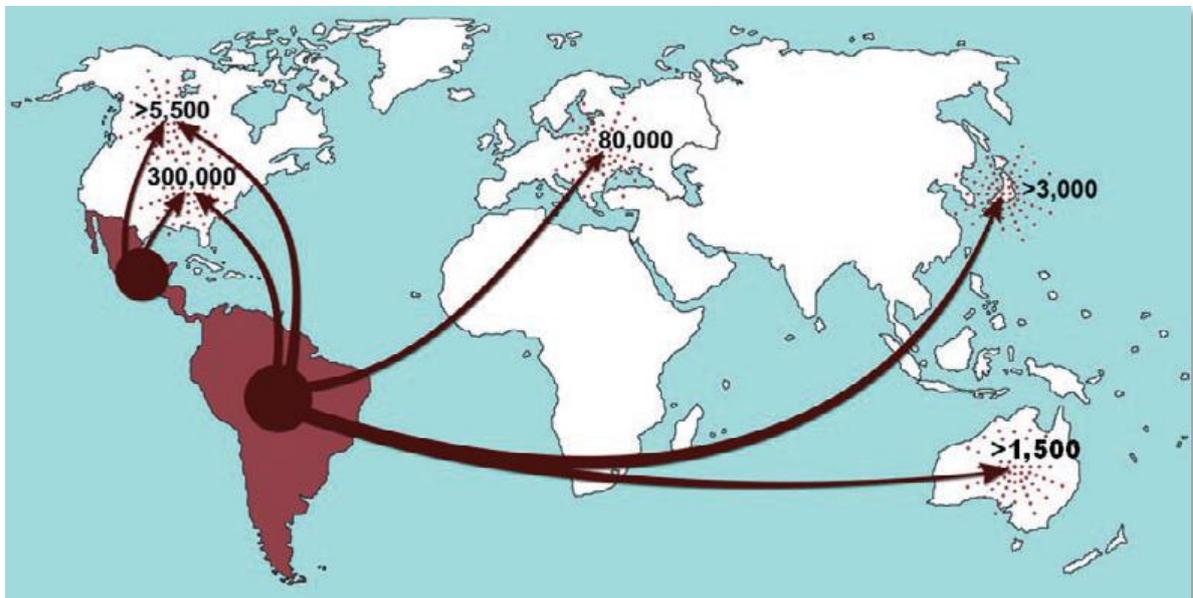


Figura 1: Rotas de migração da América Latina e a estimativa do número de indivíduos infectados em países não endêmicos. Fonte: Adaptado de Pinto Dias, 2013.

1.2 Vias de transmissão

Nos países endêmicos, a via de transmissão clássica da doença é a vetorial que acontece durante o repasto sanguíneo de triatomíneos, insetos hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiro. Atualmente são descritas cerca de 140 espécies de triatomíneos (COURA *et al.*, 2015), sendo que no Brasil até o ano de 2009 foram registradas 64 espécies, sendo que 7 possuem impacto na epidemiologia da DC (NOIREAU *et al.*, 2009): *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* (STAL, 1859), *Triatoma sórdida*, *Triatoma maculata* (ERICHSON, 1848), *Panstrongylus geniculatus* (LATREILLE, 1811) e *Rhodnius brethesi* (MATTA, 1919).

A transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e via congênita, uma vez que mulheres grávidas infectadas podem transmitir o parasito, caso haja contato entre o recém-nato e o sangue materno (DIAS; AMATO-NETO; LUNA, 2011). No ano de 2005, a cobertura sorológica já alcançava todos os hemocentros e bancos de sangues no território brasileiro (MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011). Na América Latina a pesquisa de anticorpos contra *T. cruzi* em bolsa de sangue foi iniciada no final da década de 1980, e em países não endêmicos este controle se deu posteriormente: na Inglaterra em 1998, na Espanha em 2005, nos EUA e no Japão em 2007 e no Canadá em 2010 (YASUKAWA, 2014).

Com os avanços no controle da transmissão vetorial e transfusional, a via oral se tornou a via com maior taxa de transmissão, sendo responsável por surtos de casos da forma aguda da doença (COURA JR, 2015). Estes surtos estão associados ao processamento inadequado de alimentos, levando à ingestão de comidas e bebidas contaminadas com urina e fezes de triatomíneos infectados ou com a presença do próprio vetor macerado juntamente com o alimento (De NOYA; GONZÁLEZ, 2015). Esta via vem ganhando importância nos últimos anos, principalmente na região Amazônica brasileira (COURA JR, 2015), onde o aumento do número de casos é atribuído a maior notificação e a mudanças ambientais causadas pela desflorestação, reduzindo assim a disponibilidade de mamíferos como fonte de alimento, resultando no aumento das taxas de triatomíneos infectados próximos as áreas domésticas e peridomésticas (REGINA *et al.*, 2018)

1.3 O parasito e seu ciclo biológico

T. cruzi é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae que apresenta uma relação de parasitismo obrigatório com mamíferos e insetos hematófagos da família Reduviidae. O parasito apresenta três formas evolutivas distintas, sendo duas destas replicativas (epimastigotas presentes nos hospedeiros invertebrados, e amastigotas no hospedeiro vertebrado) e uma não replicativa (tripomastigota, presente em ambos os hospedeiros) (BERN, 2011).

Com relação à organização ultraestrutural, esse parasito apresenta organelas características, como sua mitocôndria única e ramificada, que contém DNA concentrado em mini e maxi círculos interconectados formando o cinetoplasto (kDNA), que contém 30% do genoma deste protozoário. Nos tripanosomatídeos, essa estrutura está sempre próxima ao flagelo; é importante na diferenciação das formas do parasito (apresentando forma arredondada e localizado na região posterior ao núcleo em tripomastigotas; e forma de bastão e anterior ao núcleo em amastigotas e epimastigotas). Além do cinetoplasto, as formas evolutivas também são diferenciadas morfológicamente pela inserção e tamanho do flagelo, que se encontra interiorizado nas amastigotas; emergindo da região posterior em tripomastigotas e antero-lateral em epimastigotas (De SOUZA, 2009). Outras organelas são encontradas no *T. cruzi*, como os acidocalcisomos, organela de reserva energética, que acumula íons como magnésio, zinco, cálcio e sódio, sendo também responsável pela manutenção do pH e osmolaridade, e os glicosomos, que possuem função semelhante à peroxissomos, e apresentam no seu interior enzimas da via glicolítica, beta-oxidação de ácidos graxos, pentoses (DOCAMPO *et al.*, 2005). Em epimastigotas, há ainda os reservosomos, que são considerados organelas pré-lisossomais. Os microtúbulos subpeliculares, constituídos essencialmente pela proteína tubulina, representam o componente principal do citoesqueleto e se apresentam distribuídos por todo o corpo do parasito estando localizados imediatamente abaixo da membrana plasmática, com exceção da região da bolsa flagelar, onde se encontra o citóstoma, uma região de membrana altamente especializada na captação de macromoléculas, presente em amastigotas e epimastigotas (**Figura 2**) (De SOUZA, 2009).

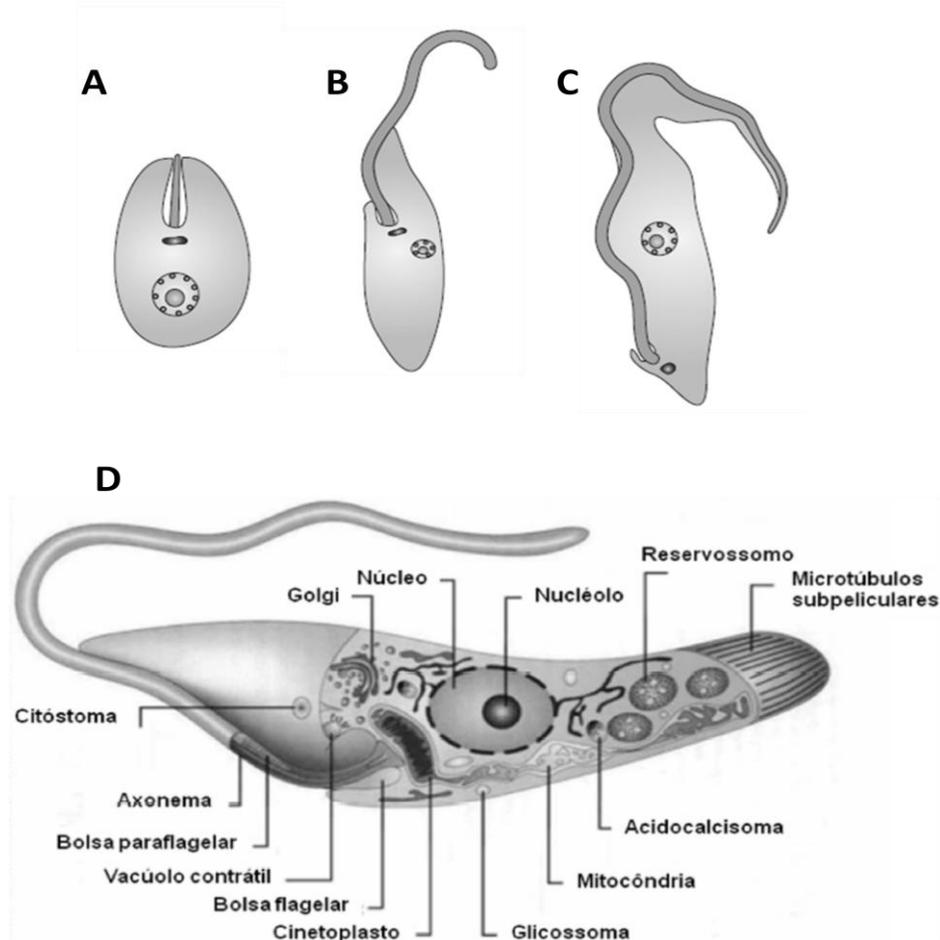


Figura 2: Representação esquemática das formas evolutivas do *T. cruzi*. (A) Amastigota, (B) Epimastigota, (C) Tripomastigota e (D) ilustração da ultraestrutura da forma Epimastigota. Fonte: adaptado de De Souza, 2008.

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* abrange um hospedeiro invertebrado e um vertebrado (**Figura 3**). No lúmen do intestino do hospedeiro invertebrado, o parasito se prolifera como forma epimastigota e na porção final do intestino se diferencia em tripomastigota metacíclico, forma infectiva para o hospedeiro vertebrado. Tripomastigotas metacíclicos são eliminados juntamente com as fezes e urina do vetor hematófago, ao realizar o repasto sanguíneo no mamífero, e penetram neste através da lesão deixada na pele pelo invertebrado.

No hospedeiro vertebrado, logo após a entrada, tripomastigotas metacíclicos infectam células presentes no local de inoculação, incluindo macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais; escapam do vacúolo fagolisosomal e se diferenciam, no citoplasma da célula hospedeira, em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Após vários ciclos reprodutivos, amastigotas se diferenciam novamente para

tripomastigotas que rompem a célula e são liberados, juntamente com amastigotas, para o espaço intercelular. A forma tripomastigota pode invadir células vizinhas e/ou entrar na corrente sanguínea, infectando outros órgãos e tecidos. Tripomastigotas na corrente sanguínea também podem ser ingeridos pelo inseto vetor, se diferenciando em epimastigotas e completando seu ciclo de vida (BERN, 2011).

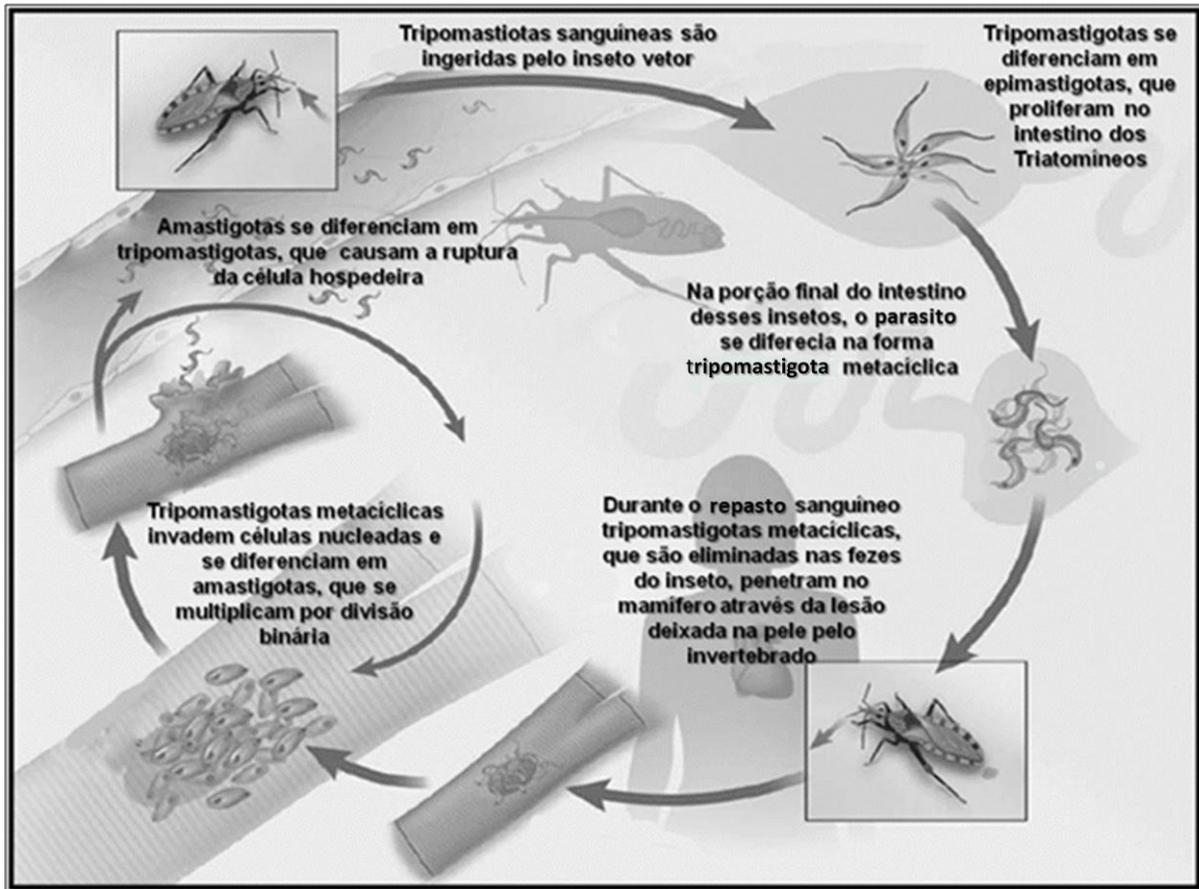


Figura 3: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: adaptado de Bern, 2011.

A variação de genótipos e fenótipos, ocasionada pela diversidade biológica nas populações do *T. cruzi*, gerou a necessidade de classificar a estrutura das populações desse parasito. Atualmente, essas diferentes populações estão divididas em seis DTUs (*discrete typing units*) de acordo com seus marcadores genéticos, designados *T. cruzi* (TC) I a VI (ZINGALES *et al.*, 2012). As diferenças genéticas observadas nestes grupos acontecem devido ao acúmulo de mutações discretas (não envolvendo eventos de troca gênica), já que se trata de um protozoário cuja reprodução se dá por meio de fissão binária (GAUNT *et al.*, 2003). Com relação à

distribuição geográfica dessas DTUs, a mais prevalente e dispersa é a TcI, encontrada na América Central e do Sul, sendo esse grupo caracterizado pela baixa sensibilidade a fármacos tripanocidas. No entanto as cepas das DTUs TcII e TcVI foram identificadas como os principais agentes causais da DC, no sul da América do Sul (ESPINOZA *et al.*, 2010)

1.4 Patologia da doença

A DC se manifesta em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia e elevadas concentrações de IgM anti-*T. cruzi*, reveladas por exames sorológicos. Esta fase possui duração de aproximadamente dois meses, sendo na maioria dos casos assintomática, podendo também apresentar sintomas pouco específicos que demoram de 8 a 10 dias, depois da infecção, para se manifestarem. Os sintomas podem incluir: dor de cabeça, dores musculares e abdominais, hepatomegalia, esplenomegalia, inchaço corporal, palidez, erupções cutâneas e o sinal de Romaña, indicativo clássico dessa fase da doença, que consiste em um edema unilateral na pálpebra. Nessa fase há alteração em exames clínicos. No eletrocardiograma (ECG), pode-se observar taquicardia sinusal, baixa tensão do complexo QRS e alterações na onda T, que indicam o comprometimento na geração e na condução do potencial de ação nas células cardíacas (RASSI; RASSI JR; MARCONDES, 2012).

Em aproximadamente 60-70% dos casos agudos não tratados, evoluem para a forma crônica indeterminada, em um período de 2 a 3 meses após o início da infecção. Essa fase consiste na presença da infecção associada à ausência de sintomatologia e a exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos normais, sendo identificada pela presença de IgG anti-*T. cruzi*, em exames sorológicos (BERN, 2011). A maioria dos pacientes permanece nesta fase por toda a vida, sendo que cerca de 30% deles evoluem, após 10-30 anos, para a fase crônica sintomática (MONCAYO; ORTIZ-YANINE, 2006), caracterizada por: parasitemia muito baixa ou quase não detectável, intenso processo inflamatório, que afeta diversos órgãos e o desbalanço da resposta imune com a persistência do parasito (TARLETON, 2003; MARIN-NETO *et al.*, 2007; BONNEY; ENGMAN, 2008). Portanto, nessa fase pode haver o desenvolvimento de sintomatologia cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (RASSI; RASSI JR; MARCONDES, 2012).

A manifestação de sintomatologia cardíaca é a mais prevalente e também com maior carga de morbidade associada (RASSI JR; RASSI; LITTLE, 2000). A miocardite chagásica crônica é caracterizada por inflamação local e difusa, com fibrose progressiva, desordens no sistema de condução elétrica cardíaca, que culminam em arritmias, aneurisma apical, fenômenos tromboembolismo, insuficiência cardíaca progressiva, podendo ocorrer ainda morte súbita (**Figura 4**) (HIGUCHI *et al.*, 2003; RASSI; RASSI JR; MARIN-NETO, 2009).

Os pacientes crônicos com comprometimento digestivo apresentam alterações da secreção, motilidade, absorção. Nos casos mais graves há o aparecimento de megavísceras (esôfago e cólon) (MENEGHELLI, 2004). Esta manifestação envolve sintomas que variam de brandos, como disfunções assintomáticas na motilidade e rigidez do músculo liso, a quadros severos em que os pacientes apresentam dificuldade para engolir, perda de peso, refluxo esofágico, tosse recorrentes e vômitos (BERN, 2011). Lesões neurológicas periféricas, também podem ser observadas, principalmente, meningoencefalites, porém isso só ocorre em apenas 3% dos pacientes chagásicos sintomáticos (HIGUCHI *et al.*, 2003; RASSI; RASSI JR; MARIN-NETO, 2009).

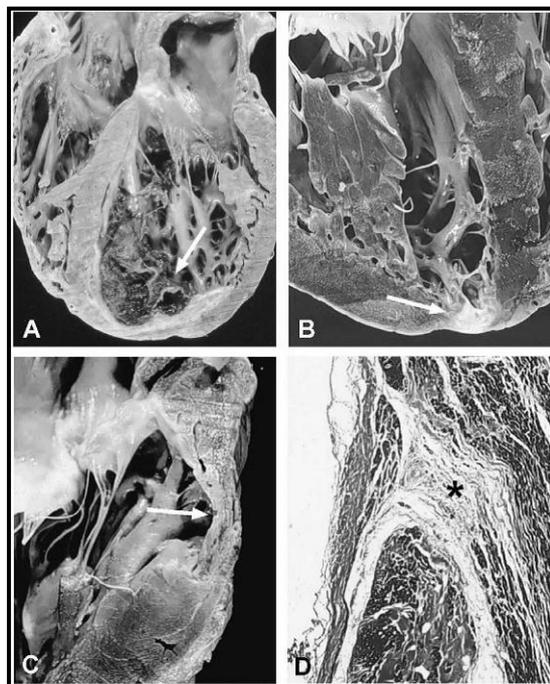


Figura 4: Cardiomiopatia chagásica. (A-C) Dilatação dos ventrículos direito e esquerdo; com observação de áreas fibrosadas e aneurisma do ventrículo esquerdo (seta). (D) fibrose difusa do miocárdio, sugestivo de injúria isquêmica. Fonte: adaptado de Higuchi *et al.*, 2003.

1.4 Diagnóstico e Tratamento da DC

O diagnóstico da DC na fase aguda é feito através da detecção de parasitos, no sangue através dos exames de gota-espessa, hemocultura e xenocultura que consistem em procedimentos simples e de baixo custo. O teste sorológico não é comumente usado nessa fase da doença, embora a detecção de IgM anti-*T. cruzi* possa ser feita (KIRCHHOFF, 2011).

Na fase crônica da doença devido à baixa parasitemia, a probabilidade de encontrar um parasita circulante é pequena. Portanto nesta fase, o ideal para um correto diagnóstico, é a realização do exame sorológico com a detecção de IgG anti-*T. cruzi*. Também é preconizado que o diagnóstico nesta fase seja feito com o uso de duas técnicas combinadas, como por exemplo, imunofluorescência e hemaglutinação, com ambos os resultados positivos (BERN, 2011; RASSI; RASSI JR; MARCONDES, 2012).

Para o tratamento etiológico são aprovadas duas drogas, o nifurtimox (**Nif**) e o benznidazol (**Bz**), ambos nitroderivados, desenvolvidos entre as décadas de 60 e 70 (**Figura 5**). No entanto, atualmente o fármaco de primeira escolha é o **Bz**, por ser o mais estudado e usado devido a sua melhor aceitação pelos pacientes e por apresentar uma boa eficácia em pacientes nas fases aguda e crônica recente da doença com índices variando de 70 - 100% de cura (RASSI; RASSI JR; MARCONDES, 2012). Estima-se que 7,6 - 29,7% dos pacientes abandonam o tratamento com **Bz** (PINAZO *et al.*, 2010; PEREZ-AYALA *et al.*, 2011) e que 14-75% dos pacientes abandonam o tratamento com o **Nif** (JACKSON *et al.*, 2010; PEREZ-MOLINA; LOPEZ-VELEZ, 2012).

O uso do **Bz** possui limitações que dificultam a realização de um tratamento adequado pelos pacientes, uma vez que podem apresentar efeitos colaterais, como: dermatites alérgicas, anorexia e perda de peso, náusea e vômito. Além disso, este medicamento requer longos períodos de administração e é contraindicado em casos de gestação, insuficiência renal e/ou hepática. A eficácia de ambos os fármacos varia de acordo com: a idade, o estado imunológico do paciente e com a cepa do parasito, que pode ser refratária a esses compostos (COURA; CASTRO, 2002; BERN, 2011; CARVALHO *et al.*, 2014). Outro problema relacionado ao **Bz** é a baixa eficácia do seu uso na fase crônica tardia, com índice de cura entre 8 - 30%, por

isso, não há um consenso sobre seu uso nesta fase da doença (BUSCHINI *et al.*, 2007; JANNIN; VILLA, 2007; CLAYTON, 2010).

Recentemente, resultados do BENEFIT, mostraram que o uso do **Bz** por pacientes crônicos não foi capaz de reverter o quadro de cardiomiopatia, já estabelecido, não havendo prevenção do avanço da doença nestes casos (MORILLO *et al.*, 2015). Não está claro se as falhas terapêuticas resultam de: diferenças na carga parasitária, acesso da droga ao parasito intracelular ou resistência adquirida durante o tratamento (YUN *et al.*, 2009; URBINA, 2010).



Figura 5: Estrutura química dos nitroderivados usados no tratamento da DC. Fonte: adaptado de Urbina, 2010.

Devido às limitações do tratamento atual da DC, esforços contínuos têm sido realizados na procura por novas drogas. A busca de novos compostos está relacionada à adoção de diferentes estratégias na pesquisa, como por exemplo, a síntese de novos derivados com foco em um alvo específico e a triagem de bibliotecas de compostos sintéticos e naturais com semelhanças estruturais a uma droga de reconhecida atividade. Diversas vias metabólicas do parasito têm sido investigadas como possíveis alvos terapêuticos, incluindo a biossíntese de ergosterol, metabolismo da tripanotona, cisteína protease, metabolismo de pirofosfato, síntese de proteínas ou DNA (SALOMÃO; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2016).

Normalmente a síntese de novos compostos é feita com a manutenção do grupamento farmacóforo de substâncias com atividades já conhecidas visando o aumento da lipofilicidade, possibilitando uma ação intracelular da droga. Quando se

trata de doenças negligenciadas outra estratégia adotada é o reposicionamento de drogas já utilizadas para outras doenças com o objetivo de serem testadas para DC, encurtando assim algumas etapas no desenvolvimento de um novo tratamento (GASPAR *et al.*, 2015). A combinação de diferentes compostos que visa uma maior eficácia e menor toxicidade também é uma estratégia terapêutica de estudo recomendado (COURA, 2009).

De acordo com a OMS, um bom agente quimioterápico deve cumprir com vários requerimentos incluindo: (a) cura parasitológica de casos agudos e crônicos; (b) alta atividade sobre tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares com alto nível de acúmulo dos tecidos e sobre diferentes cepas de *T. cruzi*; (c) não indução de resistência parasitária; (d) tratamento por administração oral e preferencialmente com poucas doses; (e) baixa toxicidade ao paciente, sem efeitos genotóxicos e teratogênicos, sendo o medicamento disponível a crianças, adultos e mulheres em fase reprodutiva; e (f) estabilidade e baixo custo de produção e comercialização (NAWAKA; HUDSON, 2006).

1.5 Compostos testados

Como alternativas para o tratamento da DC alguns compostos estão sendo testados pelo nosso grupo, *in vitro* e *in vivo*, dentre os quais se destacam: inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs) e os nitroimidazóis (SALOMÃO; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2016).

1.5.1 Inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs)

O ergosterol é o esteroide mais importante na composição da membrana plasmática de fungos e protozoários, sendo que é esse o componente que confere propriedades físicas fundamentais a membrana plasmática desses seres, tal como fluidez e permeabilidade (URBINA, 2010).

Esse lipídeo é sintetizado por uma via complexa que envolve diversas enzimas, sendo que a inibição desta via pode ser realizada tendo como alvo, diversas etapas e enzimas, mas a etapa que vem sendo mais bem estudada atualmente é a que envolve a C14 α -esteroidemetilase (CYP51). Esta enzima é eficientemente inibida por substâncias azólicas, que levam a perda das características de fluidez das membranas, levando o microorganismo à morte (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011).

Usando a estratégia de reposicionamento de drogas, IBEs desenvolvidos originalmente contra fungos, estão sendo testados no *T. cruzi*, uma vez que o parasito também possui esta via metabólica. Assim, os IBEs, tal como os triazóis, apresentam-se como uma alternativa viável e promissora para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes no tratamento da DC (SALOMÃO; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2016). Alguns destes inibidores já foram inclusive avaliados sobre o *T. cruzi*, dentre eles um que se destaca é o posaconazol (**Pz**) que apresentou atividade considerável em modelos murinos agudos e crônicos para a DC (URBINA *et al.*, 1998; MOLINA *et al.*, 2000). **Pz** já foi submetido a testes clínicos de fase II, em pacientes na fase crônica de DC; e embora tenha sido eficaz em modelos animais, ele não foi capaz de promover a cura nos pacientes portadores da doença crônica (MOLINA *et al.*, 2014). Um dos fatores que inviabiliza o uso do **Pz** é sua baixa biodisponibilidade oral e seu alto custo de produção, já que seu processo

de síntese envolve mais de 20 etapas complexas (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011; URBINA, 2015).

1.5.2 Nitroimidazóis

O **Bz** é um derivado nitroimidazólico, utilizado no tratamento etiológico da DC desde a década de 60. No entanto, até os dias de hoje o mecanismo de ação desse fármaco ainda não está completamente elucidado, porém já se sabe que **Bz** em concentrações tripanocidas não induz a produção o íon superóxido e peróxido de hidrogênio (DOCAMPO, 1979; MORENO *et al.*, 1982), portanto seu mecanismo de ação não está relacionado com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Foi proposto então, que o **Bz** seja reduzido por via anaeróbia e/ou através de modificações covalentes de macromoléculas por derivados nitroreduzidos, formando um metabólito intermediário, que se liga covalentemente a lipídeos, ao DNA e a proteínas (POLAK; RICHLE, 1978; DIAZ-DE-TORANZO *et al.*, 1988).

Outro composto nitroimidazólico caracterizado como um potente agente microbicida e também tripanocida é o Megazol (**Mg**), (FILARDI; BRENER, 1982; De CASTRO; MEIRELLES, 1990). A investigação do **Mg** para uso na quimioterapia da DC é de grande interesse, pois o mesmo se mostrou efetivo sobre cepas resistentes a **Nif** e a **Bz**. O mecanismo de ação sobre protozoários é atribuído a sua capacidade em interferir no metabolismo de tióis, especialmente a tripanotiona, substrato da tripanotiona redutase (VIODÉ *et al.*, 1999; MAYA *et al.*, 2003). Apesar da sua potente ação tripanocida, este composto não foi aprovado para o uso na clínica devido a relatos do seu potencial mutagênico e genototóxico *in vivo* (NESSLANY *et al.*, 2004; POLI *et al.*, 2002).

Com a investigação de análogos de **Mg** comprovou-se que o grupo nitro é responsável pela mutagenicidade e genotoxicidade. Visando contornar este problema, diferentes séries de derivados de megazol têm sido sintetizadas e ensaiadas sobre o *T. cruzi*, sendo que vários derivados já se mostraram ativos sobre o parasito (CARVALHO *et al.*, 2014).

1.6 Objetivos

1.6.1 Geral

Identificar compostos mais eficientes para o tratamento etiológico da DC.

1.6.2 Específicos

- Determinar o efeito *in vitro* de compostos híbridos, sintetizados a partir do protótipo piridínico (inibidor de CYP51) com a subunidade 1,3,4-tiadiazólica do **Mg** sobre tripomastigotas sanguíneos e amastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y (TcII) e cepa Tulahuen (TcVI);
- Determinar a toxicidade dos compostos mais ativos sobre macrófagos peritoneais e células cardíacas de embriões de camundongos;
- Correlacionar atividade sobre *T. cruzi* com a estrutura química dos compostos;
- Determinar o mecanismo de ação dos compostos mais ativos e com menor citotoxicidade.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Metodologia

2.1.1 Síntese dos compostos

Os compostos testados neste trabalho foram sintetizados pelos Drs. Carlos Alberto Manssour Fraga (LASSBio, UFRJ) e Rosana Freitas (LASSBio, UFRJ) (Figura 6). São eles: 1947, 1948, 1949, 1959, 1947HCl, 1948HCl, 1949HCl, 1959HCl, RF-4P, RF-20, RF-17, RF-6AID, RF-7, RF-40B, RF-1, 2034, 2035, 2033, 2031, 2030, 2085, 2035HCl, 2035 complexada ao Rutênio e 2086. Estes compostos seguiram o planejamento estrutural baseado na hibridação molecular de um protótipo piridínico, já descrito na literatura como um inibidor da biossíntese de ergosterol, agindo sobre a enzima de *T. cruzi*, CYP51 (HARGROVE *et al.*, 2013), e a subunidade 1,3,4-tiadiazólica do **Mg**, composto este com potente ação tripanocida (SALOMÃO *et al.*, 2010; POLI *et al.*, 2002). O radical *p*-fluor-fenil foi adicionado a alguns desses compostos, pois como já foi descrito na literatura, a presença do mesmo confere proteção aos grupos farmacofóros dessas moléculas, uma vez que esse radical é extremamente eletronegativo (GILLIS *et al.*, 2015).

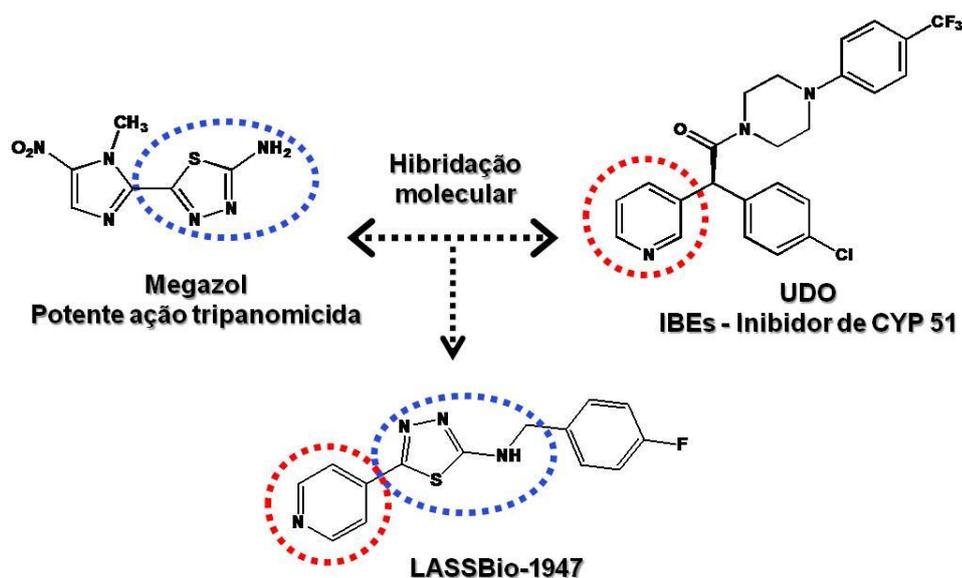


Figura 6: Planejamento estrutural dos compostos híbridos do protótipo piridínico, com a subunidade 1,3,4-tiadiazólica do **Mg**.

2.1.2 Parasitos

Para os ensaios sobre o *T. cruzi* foram utilizadas as cepas: Tulahuen, que é geneticamente modificada para expressar o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* (ROMAÑA *et al.*, 2010); e a cepa Y, cuja forma tripomastigota, foi obtida de camundongos albinos Swiss infectados no pico da parasitemia (7º dias pós-infecção).

Todos os experimentos foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz), por meio da licença LW 16/13, e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos (“Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents/NACLAR”). Os animais experimentais foram cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

2.1.3 Avaliação do efeito dos compostos sobre *T. cruzi* da cepa Y

Os ensaios com a forma tripomastigota sanguínea foram realizados em placas de 96 poços, com concentrações dos compostos que variaram de 0,07 a 1000 μ M e com uma concentração final de 5×10^6 parasitos/ml em meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Cultlab), 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% penicilina-estreptomicina (10.000 unidades) (Sigma-Aldrich), por 24 h a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, na ausência de sangue. A atividade foi expressa pelo parâmetro IC₅₀ que corresponde à concentração do composto que lisa 50% do parasito. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes para o cálculo da média e do desvio padrão.

Para a avaliação sobre amastigota intracelular, culturas primárias de células cardíacas de embriões de camundongos (MEIRELES, 1986) foram infectadas com tripomastigotas por 24h, na razão de 10:1 (parasito:célula). Após o período de interação dos parasitos de 24h, a cultura foi lavada para que fossem removidos os parasitos não internalizados e os compostos foram adicionados nas concentrações de 100 a 1000 μ M e por 24 e 48 horas. A seguir, as culturas foram fixadas e coradas pelo método de Panótico Rápido (Laborclin) para posterior quantificação da infecção

e do número de parasitos através da microscopia óptica de campo claro. O resultado foi expresso através do percentual de infecção e índice endocítico (IE), que se refere ao número de parasitos/100 células, correlacionando assim o percentual de infecção com o número de parasitos por célula infectada.

2.1.4 Avaliação do efeito dos compostos sobre *T. cruzi* da cepa Tulahuen

Para avaliar os efeitos dos compostos sobre amastigotas intracelulares da cepa Tulahuen, foi utilizada a linhagem de fibroblastos L929, obtida da “American Type Culture Collection” (Manassas, VA). Essas células foram infectadas com tripomastigotas desta cepa, que expressam o gene da β -galactosidase de *E. coli*, na razão de 10:1 (parasito:célula), por 2h. A cultura foi mantida por 48h para o estabelecimento da infecção e em seguida, a mesma foi tratada com os compostos com concentrações que variaram de 0,15 a 10 μ M, por mais 96 h a 37°C. Após esse período foi adicionado o reagente glicosídeo vermelho de clorofenol (CPRG) (Sigma-Aldrich) em solução Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) e a placa foi incubada por mais 18h. Após esse período foi realizada a leitura em 570 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M3). O resultado foi expresso em percentual de inibição parasitária, comparando com células infectadas e não tratadas (ROMANHA *et al.*, 2010).

2.1.5 Avaliação da toxicidade *in vitro* sobre células de mamíferos

Culturas de macrófagos peritoneais obtidas a partir do lavado peritoneal de camundongos albinos Swiss, não infectadas, foram tratadas com os compostos com concentrações que variaram de 50 a 1000 μ M por 24h para a avaliação da toxicidade para células de mamíferos. Os compostos com maior índice de seletividade foram testados também em culturas primárias de células cardíacas de embriões de camundongos nos tempos de 24 e 48h. Para a avaliação da viabilidade celular utilizou-se o reagente PrestoBlue (Invitrogen) e o ensaio se baseia na reação de óxido-redução através da redução do reagente resazurina pelo sistema de transporte de elétrons das células viáveis. A fluorescência foi medida em fluorímetro (SpectraMax M3) com emissão de 590nm, para determinação do valor de LC₅₀, concentração que reduz em 50% a viabilidade celular. Com esse resultado é possível calcular o índice de seletividade (IS), que é a razão do LC₅₀ sobre a célula

hospedeira e o IC_{50} sobre o parasito, que indica o quanto o composto é mais tóxico sobre o parasito do que sobre as células de mamíferos.

2.1.6 Análise dos parasitos tratados por citometria de fluxo

Tripomastigotas sanguíneos, da cepa Y, foram tratados com o composto selecionado por 24h nas concentrações correspondentes aos valores de IC_{50} e $1/2 IC_{50}$ e $2x IC_{50}$. Após esse período de tratamento os parasitos foram marcados com iodeto de propídeo (PI) (Sigma-Aldrich), para avaliação da integridade de membrana, na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$, por 15 min a 37°C . PI é um intercalante de DNA que não penetra células viáveis, apenas células necróticas com dano na membrana plasmática. O dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo.

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), os parasitos foram marcados com $10 \mu\text{M}$ por 30 min com dihidroetídio (DHE) (Sigma-Aldrich). DHE é permeável a membranas celulares e sofre oxidação por radicais superóxidos a etídeo, que por sua vez é um intercalante de DNA e permanece no interior da célula (ZHAO *et al.*, 2003). A antimicina A (Sigma-Aldrich) foi utilizada como controle positivo, já que a mesma se liga a sítios específicos da citocromo c redutase (complexo III da cadeia transportadora de elétrons), interrompendo a formação do gradiente de prótons pela membrana interna mitocondrial, inibindo assim, a produção de ATP e gerando grande quantidade de superóxido.

Por fim, para a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) os parasitos foram marcados com 10 nM de metil éster de tetrametilrodamina (TMRE) (Sigma-Aldrich) por 30 min a 37°C . O TMRE trata-se de uma molécula permeável carregada positivamente, que se acumula na mitocôndria ativa, devido à carga negativa da organela. Uma mitocôndria inativa ou despolarizada tem um menor potencial de membrana e falha em seqüestrar o TMRE. Como controle da dissipação do $\Delta\Psi\text{m}$, os parasitos foram pré-tratados com $10 \mu\text{M}$ de carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) (Sigma-Aldrich) por 30min. O mesmo é um ionóforo desacoplador da fosforilação oxidativa, responsável pela anulação da marcação mitocondrial pelo TMRE.

Foram capturados 10.000 eventos em cada condição no citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, CA, USA). Usando o programa Summit, foi avaliado o percentual de células marcadas e a mediana da fluorescência emitida.

2.1.7 Análise dos parasitos por microscopia eletrônica de transmissão

Tripomastigotas (5×10^6 parasitas/ml) foram tratados por 24h com o composto selecionadas concentrações correspondentes ao IC_{50} e $2 \times IC_{50}$. O material foi processado para microscopia eletrônica de transmissão de rotina. Após sucessivas lavagens, os parasitos foram fixados por 40 min a temperatura ambiente em 2,5% de gluteraldeído (Sigma-Aldrich). Posteriormente as amostras foram lavadas e pós-fixadas por 30 min à temperatura ambiente em 1% tetróxido de ósmio (Merck) acrescido de 0,8% ferricianeto de potássio e 2,5mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich). A seguir as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (Sigma-Aldrich). O material foi impregnado com uma mistura de acetona e resina EPON (Sigma-Aldrich) "overnight", a seguir em resina pura por 4h a temperatura de 22-28°C, sendo então incluído em nova amostra de resina pura e polimerizado por 3 dias a 60°C. Cortes ultrafinos foram obtidos com ultramicrótomo e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM1011 (Plataforma Tecnológica de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz).

2.1.8 Análise dos parasitos por microscopia eletrônica de varredura

Tripomastigotas (5×10^6 parasitos/ml) foram tratados por 24h com o composto selecionado nas concentrações correspondentes ao IC_{50} e $2 \times IC_{50}$. O material foi processado para microscopia eletrônica de varredura de rotina. Após sucessivas lavagens, os parasitos foram fixados por 40 min a temperatura de 22-28°C em 2,5% de gluteraldeído (Sigma-Aldrich). Posteriormente as amostras foram lavadas e pós-fixadas por 30 min à temperatura ambiente em 1% tetróxido de ósmio (Merck). A seguir as amostras foram aderidas em lamínulas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), desidratados em etanol (Sigma-Aldrich) e secos pelo método do ponto crítico. As células foram metalizadas com ouro antes de serem observadas e fotografadas pelo microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM-6390-LV) (Plataforma Tecnológica de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz).

2.2 Resultado e Discussão

Dos 23 compostos testados sobre a forma tripomastigota sanguínea (cepa Y), 8 apresentaram atividade melhor do que os IBEs de referência, **Pz** e **Cz**, sendo estes: **1947**, **1947HCl**, **2033**, **2034**, **2086**, **2035**, **2035HCl** e **2035/Ru (Quadro 1)**. Os compostos **2035** e **2035HCl** tiveram atividade superior aos nitroimidazóis de referência, **Mg** e **Bz**, sendo esses os compostos com maior atividade tripanocida da série ($IC_{50}/24h = 6,7 \mu M$ e $3,6 \mu M$, respectivamente). A notável atividade do composto **2035** é explicada pela inserção de um segundo átomo de nitrogênio, ligando o anel triazólico com a pirimidina. A partir da molécula **2035**, foram sintetizados **2035HCl** e **2035Ru (Figura 7)**, com o objetivo de aumentar a atividade tripanocida, o que de fato, aconteceu com a molécula **2035HCl** que teve maior atividade com a inserção de um átomo de cloro em sua composição, tornando a mesma mais polar. Contudo, o mesmo não foi observado com o composto **2035Ru** que teve sua ação sobre o parasito diminuída com a inserção do átomo de rutênio.

Os compostos **1947** e **1947HCl** também apresentaram boa atividade sobre o parasito, sendo o **1947HCl** ($IC_{50}/24h = 10,24 \mu M$) mais ativo que o **1947** ($IC_{50}/24h = 16,6 \mu M$) (**Figura 8**). Essa maior ação tripanocida pode ser explicada pela presença do átomo de cloro ligado a pirimidina. O grupo de pesquisa do Drs. Carlos Alberto Manssour Fraga (LASSBio, UFRJ) acredita que a inserção desse halogênio torna a molécula mais polar, facilitando assim a permeabilidade dessa droga para o meio intracelular. Contraditoriamente, a presença do átomo de cloro nas moléculas **1948HCl** e **1959HCl** diminuiu a atividade tripanocida das mesmas.

Os compostos com menor atividade sobre o *T. cruzi* foram: **RF-4P**, **RF-17** e **RF-7**. A baixa ação tripanocida **RF-7** e **RF-4**, sugere que a abertura do anel triazólico desses compostos não favorece a atividade dessas drogas contra o parasito (**Figura 9**). A baixa atividade de **RF-17**, composta apenas pelo anel triazólico e pela pirimidina, reforça a importância do radical *p*-fluor-fenil, cuja função é preservar os grupamentos farmacóforos dessas moléculas (GILLIS *et al.*, 2015).

Alguns compostos foram selecionados, de acordo com a sua estrutura química e atividade tripanocida, para a avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos. Para isso foram usados macrófagos peritoneais tratados por 24 h. Com os valores de $LC_{50}/24h$ foi possível calcular o IS das mesmas (**Quadro 1**).

A maioria dos compostos foi mais ativa sobre o parasito do que sobre macrófagos peritoneais. As únicas exceções dessa série foram os compostos **1948HCl** e **1959HCl**. As duas drogas com maior IS em macrófagos foram **2035** e **1947HCl** (IS= 66,1 e 66,6; respectivamente). Por essa razão esses compostos foram selecionados para serem testados em culturas primárias de células cardíacas de embriões de camundongos, que costumam ser mais sensíveis para testes de citotoxicidade (**Quadro 2**).

Os resultados indicaram que o composto **1947HCl** também foi pouco tóxico sobre cardiomiócitos, porém o mesmo resultado não foi observado com o composto **2035**, que apresentou uma toxicidade maior sobre os cardiomiócitos quando comparados aos macrófagos peritoneais. Por esta razão a continuidade dos ensaios para avaliação da atividade sobre amastigotas intracelulares deu-se apenas com o composto **1947HCl**. Para tal, foram usadas culturas primárias de células cardíacas, infectadas com tripomastigotas sanguíneos e posteriormente tratadas com o composto nos tempos de 24 e 48 h. Após esse período as culturas foram fixadas e coradas para avaliação da atividade do composto através da quantificação do percentual de infecção e o número de parasitos por célula infectada. Resultados preliminares indicam uma redução do índice endocítico (IE), em todas as concentrações e em ambos os tempos de tratamento, porém serão necessários mais experimentos para melhor avaliação desse parâmetro (**Figura 10**).

Quadro 1: Atividade dos compostos híbridos sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y) expressa através do parâmetro IC₅₀/24h. Citotoxicidade dos mesmos sobre macrófagos peritoneais expressa através do parâmetro LC₅₀/24h, e o cálculo do índice de seletividade (IS), que é a razão do LC₅₀/24h pelo IC₅₀/24h.

Composto	IC ₅₀ /24h (µM) tripomastigotas sanguíneos (37°C)	LC ₅₀ /24h (µM) Macrófagos	IS MØ
1947	16,6 ^a ± 0,9 ^b	401,31 ^a ± 41,38 ^b	24,18
1948	226,5 ± 17,6	>1000	4,42
1949	190,4 ± 19,7	192,62 ± 5,8	1,01
1959	81,2 ± 5,9	119,65 ± 8,78	1,47
1947 HCl	10,24 ± 2,61	682,00 ± 57,89	66,60
1948 HCl	541,32 ± 38,16	206,02 ± 17,54	0,38
1959 HCl	170,80 ± 13,71	147,49 ± 22,64	0,86
RF-4P	>1000	-	-
RF-20	832,9 ± 48,1	-	-
RF-17	>1000	-	-
RF-6AID	338,4 ± 33,0	-	-
RF-7	>1000	-	-
RF-40B	340,5 ± 45,0	-	-
RF-1	215,0 ± 6,9	-	-
2034	9,3 ± 3,0	56,09 ± 4,79	6,03
2035	6,7 ± 0,8	443,3 ± 13,7	66,1
2033	9,5 ± 2,3	72,84 ± 2,45	7,67
2031	21,6 ± 3,7	102,70 ± 10,63	4,75
2030	168,6 ± 25,8	412,82 ± 41,22	2,44
2085	182,9 ± 11,7	391,7 ± 23,7	2,14
2035 HCl	3,6 ± 0,5	96,66 ± 8,26	26,85
Comp. de Ru 2035	12,0 ± 1,4	125,05 ± 25,19	10,42
2086	52,2 ± 7,1	Nd	Nd
Cetoconazol	118,3 ± 16,1	271,71 ± 37,77	2,30
Posaconazol	>500	104,63 ± 19,63	< 0,20
Megazol	9,9 ± 0,8	Nd	Nd
Benznidazol	10,3 ± 1,36	>4000	>400

^aMédia de no mínimo 3 experimentos em duplicata; ^bDesvio padrão; ^c Não determinado.

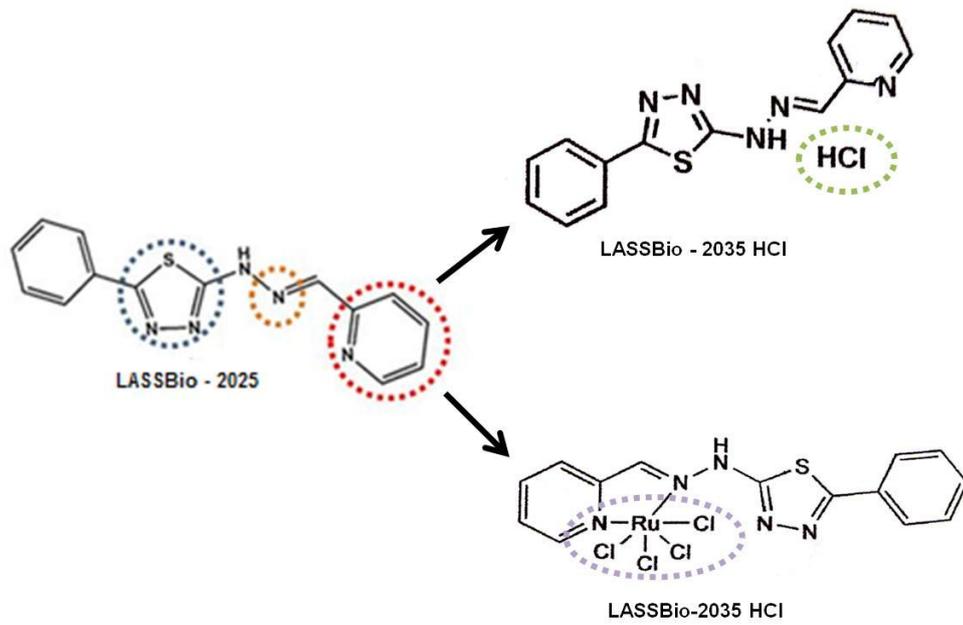


Figura 7: Estrutura química das moléculas mais ativas contra o *T. cruzi*, destacando o anel triazólico (em azul), a pirimidina (em vermelho) e um segundo átomo de nitrogênio fazendo a ligação entre esses dois grupamentos (em laranja). Na figura, também está em destaque a inserção do átomo de cloro na molécula **2035HCl** (em verde); e a inserção do complexo de rutênio no composto **2035Ru** (em lilás).

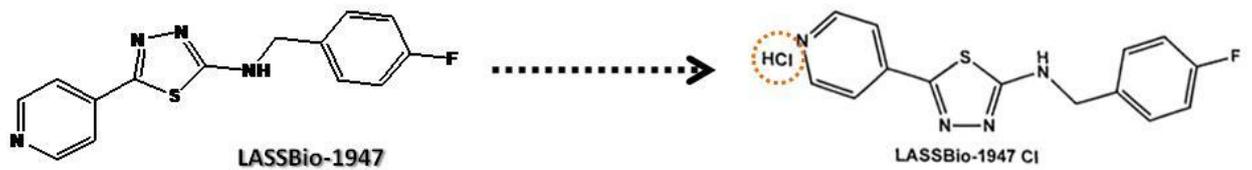


Figura 8: Estrutura química do composto **1947** e **1947HCl**, mostrando a inserção do átomo de cloro na pirimidina (em amarelo).

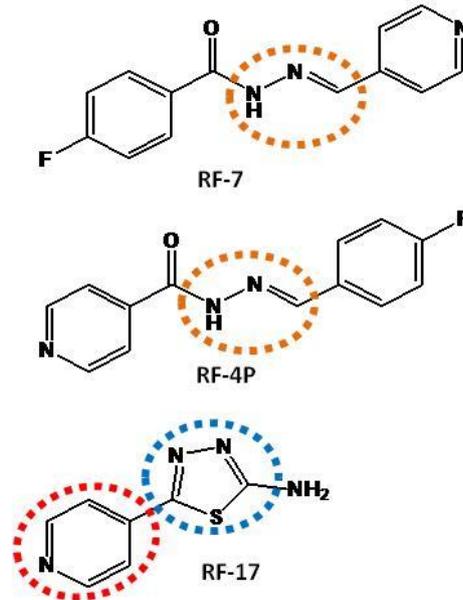


Figura 9: Estrutura química dos compostos menos ativos, salientando a abertura do anel (em laranja), o anel triazólico (em azul) e a pirimidina (em vermelho).

Quadro 2: Citotoxicidade dos compostos **2035** e **1947HCl** sobre culturas primárias de células cardíacas, expressa através do parâmetro LC_{50} , e o IS, nos tempos de 24 e 48 h.

Composto	$IC_{50}/24h$ (μM)	$LC_{50}/24h$ (μM)	$LC_{50}/48h$ (μM)	IS MC	IS MC
	tripomastigotas sanguíneos	Cardiomiócitos	Cardiomiócitos	24h	48h
1947 HCl	$10,24 \pm 2,61$	$423,79^a \pm 52,74^b$	$333,61^a \pm 50,98^b$	41,38	32,57
2035	$6,7 \pm 0,8$	$29,86 \pm 4,30$	$16,67 \pm 2,81$	4,45	2,48

^aMédia de no mínimo 3 experimentos em duplicata; ^bDesvio padrão.

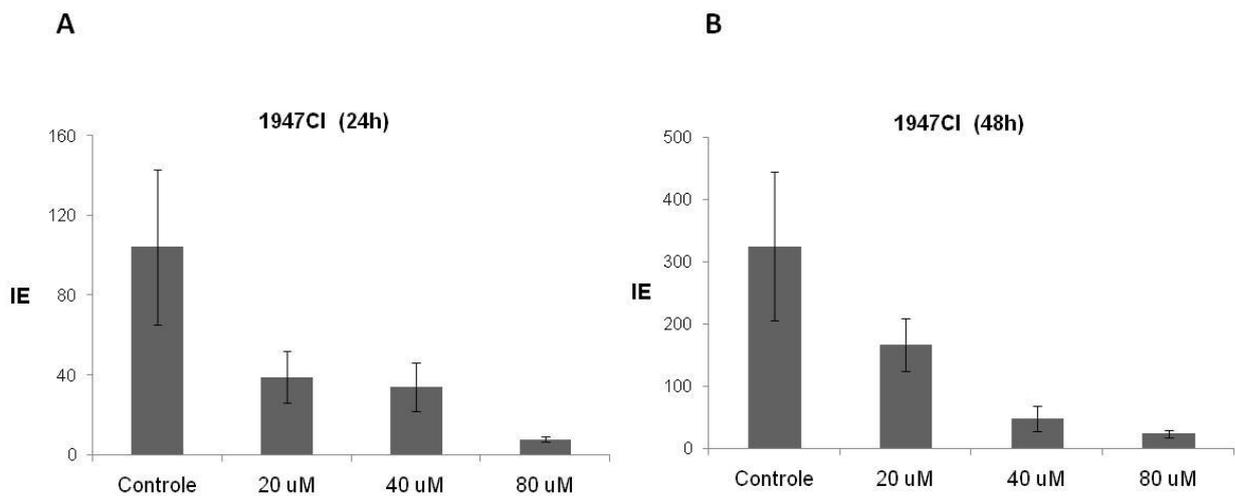


Figura 10: Dados preliminares do índice endocítico (IE). Culturas primárias de células cardíacas tratadas por 24 (A) e 48 h (B) com o composto **1947HCl**, em diferentes concentrações (n=2).

Buscando investigar o mecanismo de ação do composto **1947HCl** sobre tripomastigotas sanguíneos foi feita a avaliação do possível dano de membrana plasmática (**Figura 11**), da geração de ROS (**Figura 12**) e no potencial hidrogeniônico da membrana mitocondrial (**Figura 13**), após o tratamento por 24h. Tal abordagem foi necessária uma vez que os possíveis mecanismos de ação dessa série de drogas são: a inibição da enzima CYP51, essencial para a biossíntese de ergosterol, um importante componente da membrana plasmática (LEPESHEVA *et al.*, 2011); e a geração de ROS (VIODÉ *et al.*, 1999). Curiosamente, os resultados indicaram não haver aumento na geração de ROS e dano na membrana plasmática. No entanto, há redução no potencial de membrana mitocondrial dos parasitos tratados com 20 μM ($2 \times \text{IC}_{50}/24\text{h}$) do composto **1947HCl**, através do percentual de células positivas para TMRE, porém essa diferença não foi significativa.

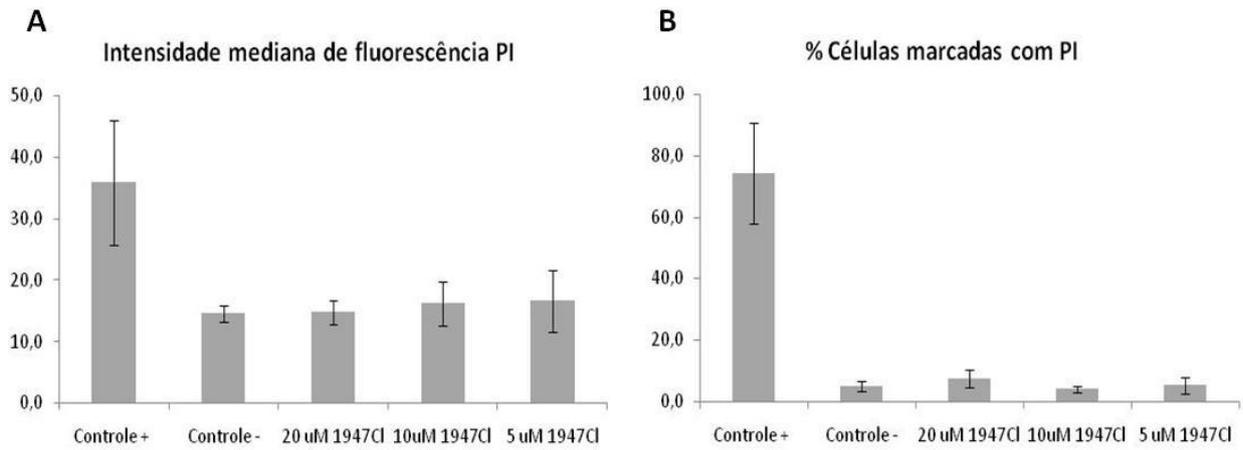


Figura 11: Marcação de PI em tripomastigotas tratados com **1947HCl** por 24h em diferentes concentrações. **(A)** Mediana da intensidade de fluorescência e **(B)** % células marcadas com PI.

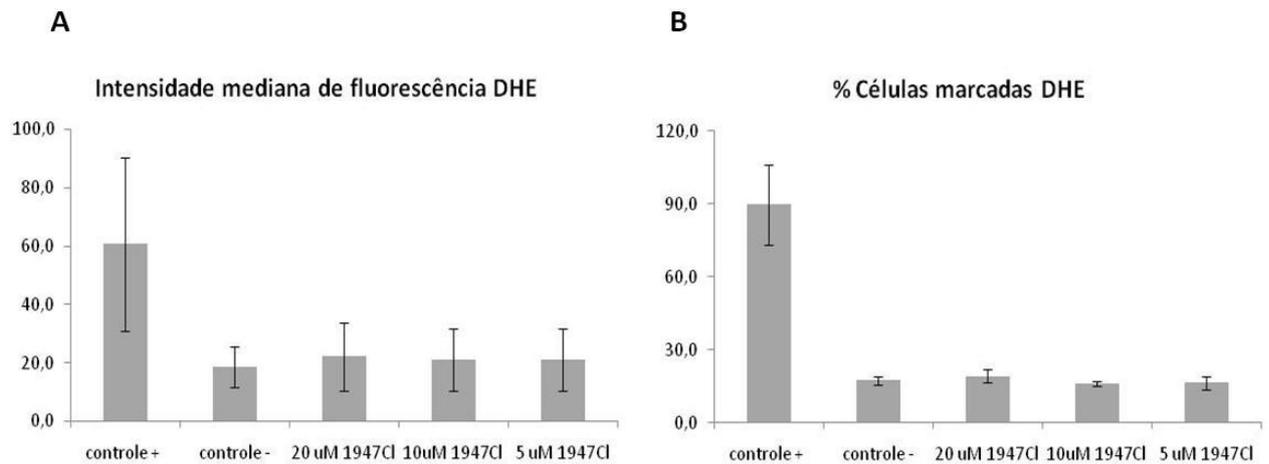


Figura 12: Marcação de DHE em tripomastigotas tratados com **1947HCl** por 24h em diferentes concentrações. **(A)** Mediana da intensidade de fluorescência e **(B)** % células marcadas com DHE.

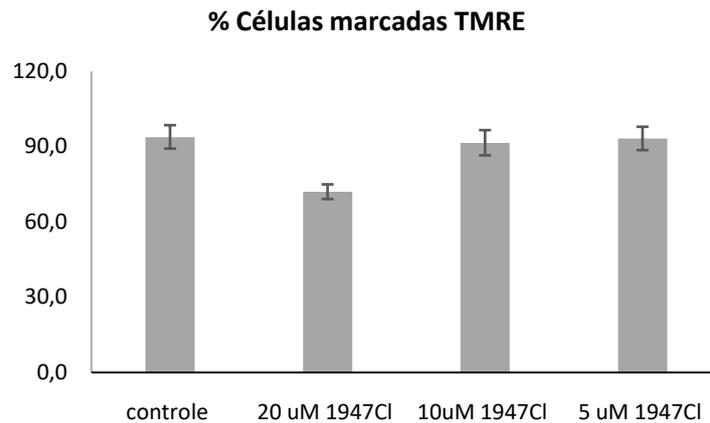


Figura 13: Marcação de TMRE em tripomastigotas tratados com **1947HCl** por 24h em diferentes concentrações.

Com relação à ultraestrutura dos parasitos tratados com **1947HCl**, resultados preliminares mostraram que os parasitos submetidos ao tratamento por 24h e processados para MET, apresentam a formação de “blebs” da membrana plasmática do corpo e do flagelo dos parasitos, tais estruturas podem ser vesículas características de células em processo de apoptose (**Figura 14**) (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009). Além disso, observaram-se muitas células com o cinetoplasto em forma de barra, formato característico de amastigotas (De SOUZA, 2009) (**Figura 15**). Já a análise da MEV evidenciou que o tratamento com o composto **1947HCl** gerou retração no corpo do parasito, o que levou ao arredondamento do corpo do parasito, similar ao observado na forma amastigota, como também a perda da estrutura flagelar, corroborando os resultados observados em MET (**Figura 16**).

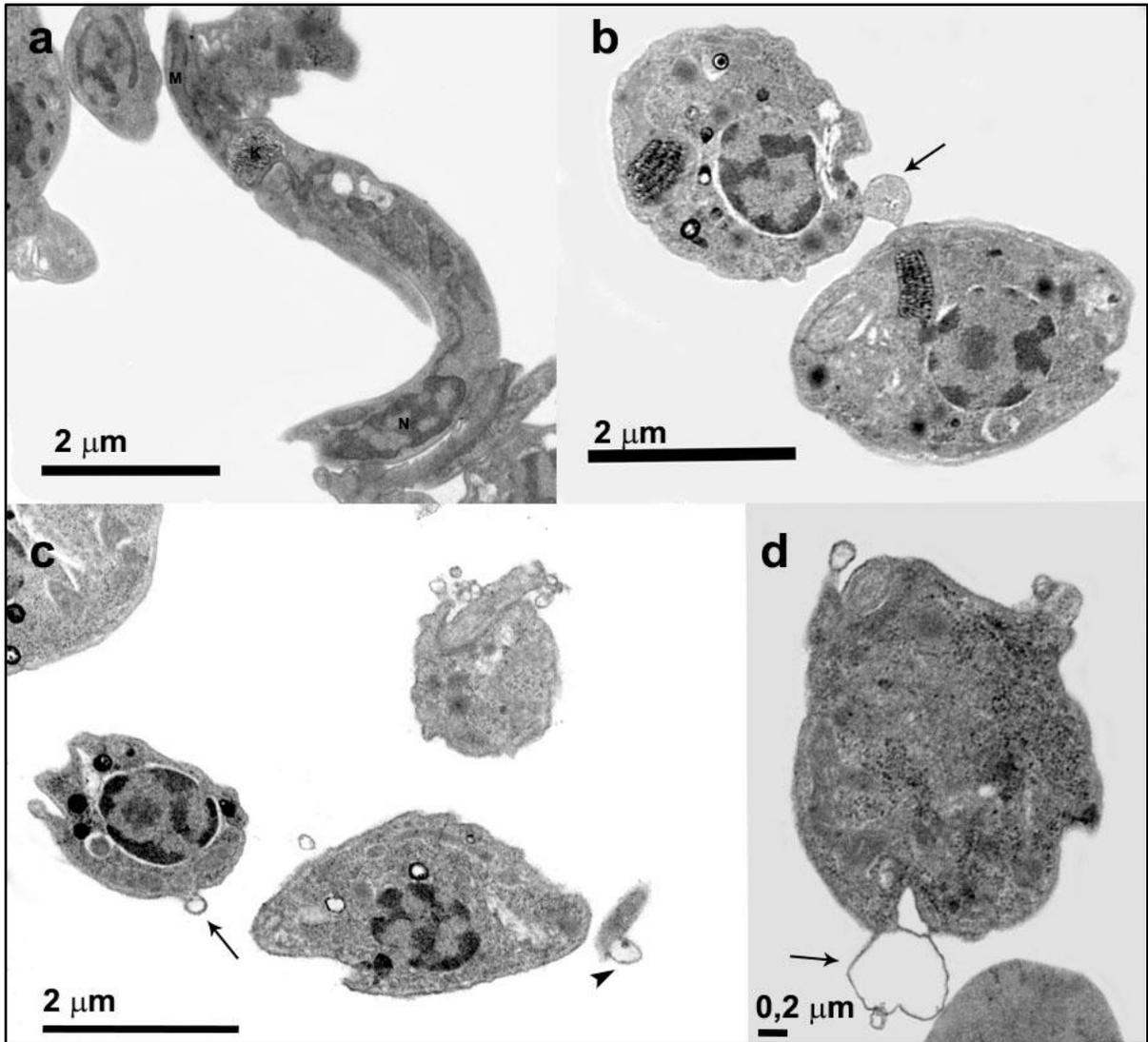


Figura 14: Análise ultraestrutural de tripomastigotas: **(a)** controle com morfologia típica de cinetoplasto (K), núcleo (N) e mitocôndria (M); **(b-d)** tripomastigotas tratados com 10 μM ($\text{IC}_{50}/24\text{h}$) **1947HCl** com a formação de “blebs” na membrana plasmática do corpo do parasito (seta fina) e no flagelo (cabeça de seta).



Figura 15: Análise ultraestrutural de tripomastigotas tratados com 10 µM (IC₅₀/24h) de **1947HCl**, evidenciando a alteração cinetoplasto, que se encontra em forma de bastão (cabeça de seta).

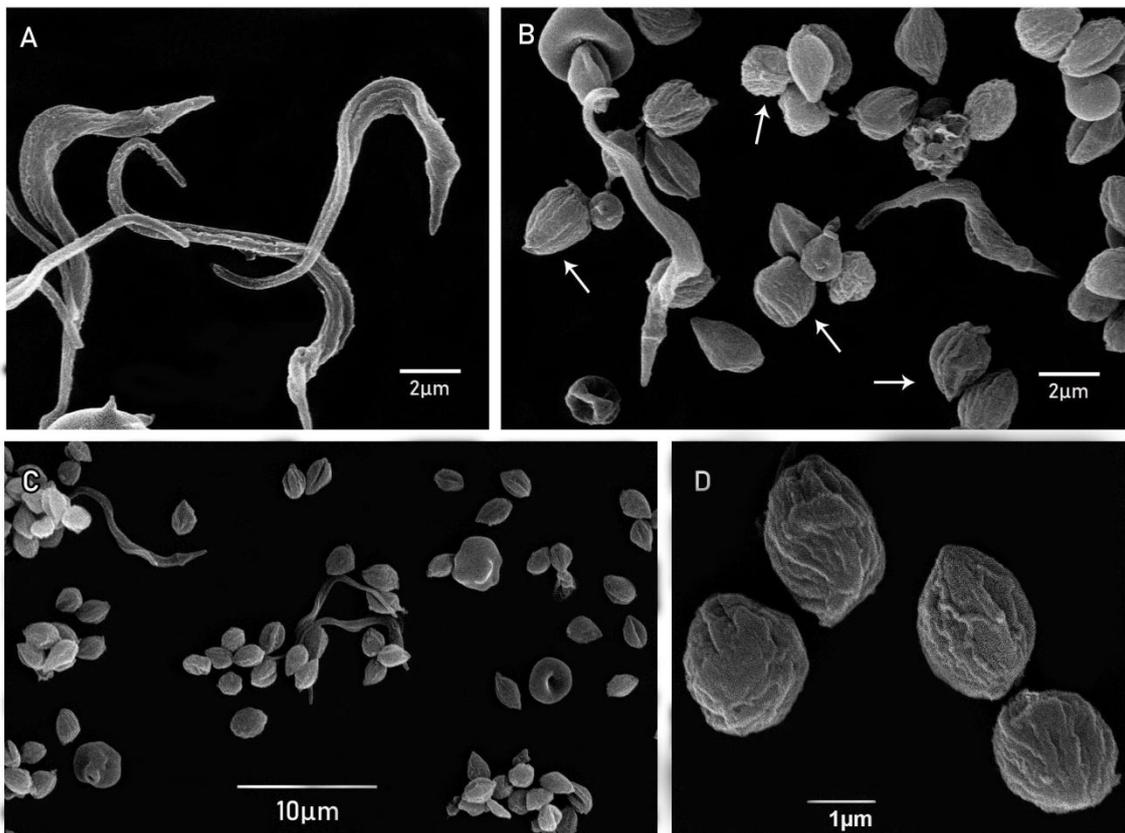


Figura 16: Análise da microscopia de varredura de tripomastigotas: **(A)** controle com morfologia típica, tripomastigotas com forma alongada e flagelo localizado lateralmente, na região posterior do parasito; **(B-D)** tripomastigotas tratados com 10µM **1947HCl** por 24 h mostrando a retração e o arredondamento do corpo do parasito e a perda da estrutura flagelar (seta fina).

Os compostos mais ativos da série foram selecionados para testes na cepa Tulahuen, que permite um maior tempo de tratamento (96h) e uma avaliação do composto sobre um parasito pertencente a uma DTU diferente da cepa Y (**Quadro 3**). Tal abordagem foi necessária uma vez que um dos possíveis mecanismos de ação desses compostos é a inibição da enzima CYP51, responsável pela biossíntese de ergosterol, sendo, portanto, necessário um maior tempo de exposição à droga para que haja perda de fluidez na membrana do parasito causando a morte desse microorganismo.

Os compostos mais ativos até o momento foram o **2035** e **2033** (**Figura 17**). Ambos foram mais ativos sobre amastigotas intracelulares da cepa Tulahuen do que os IBEs de referência **Cz** e **Pz**, nessas condições. A droga **2033** possui além do anel tiadiazólico, duas pirimidinas em sua estrutura química. A existência de três grupamentos farmacóforos pode explicar a excelente atividade tripanocida dessa molécula em ambas as cepas testadas (Y e Tulahuen).

Os compostos **1947HCl**, **1948HCl** e **1959HCl**, também tiveram suas atividades tripanocidas testadas sobre a cepa Tulahuen, porém no primeiro ensaio de dose única, com tratamento de 10 μM , eles não atingiram o percentual de inibição parasitaria maior que 50%, e devido a essa baixa atividade, novos ensaios com esses compostos serão feitos utilizando maiores concentrações.

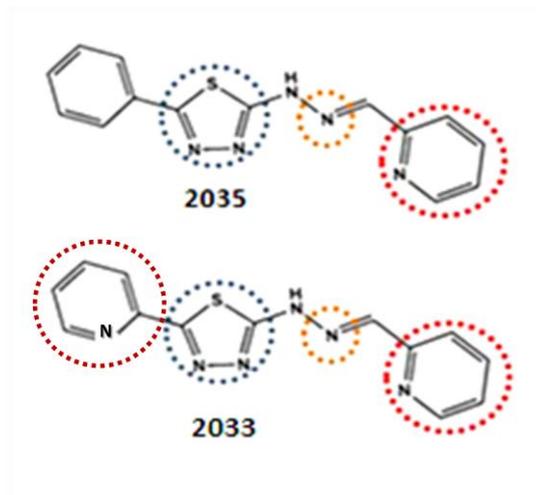


Figura 17: Estrutura química das moléculas mais ativas contra o *T. cruzi* da cepa Tulahuen, destacando o anel triazólico (em azul), a pirimidina (em vermelho), o segundo átomo de nitrogênio fazendo a ligação entre esses dois grupamentos (em laranja).

Quadro 3: Efeito dos compostos híbridos sobre formas intracelulares da cepa Tulahuen de *T. cruzi*. As culturas infectadas foram tratadas por 96 h, e o resultado foi expresso através do parâmetro $IC_{50}/96h$, que corresponde à concentração do composto que inibe em 50% a proliferação do parasito.

Composto	$IC_{50}/96h$ (μM) parasitos intracelulares cepa Tulahuen (37°C)
1947	$11,0^a \pm 2,2^b$
1948	$68,2 \pm 1,5$
1949	$135,4 \pm 44,7$
1959	Nd ^c
1947 HCl	Nd
1948 HCl	Nd
1959 HCl	Nd
2033	$1,67 \pm 0,16$
2031	$4,18 \pm 0,31$
2034	$3,86 \pm 0,20$
2035	$1,70 \pm 0,25$
Cetoconazol	$2,4 \pm 0,1$
Posaconazol	$2,6 \pm 0,4$

^aMédia de no mínimo 3 experimentos em duplicata; ^bDesvio padrão; ^c Não determinado.

3. CONCLUSÕES

- Dos 23 compostos testados sobre a cepa Y, 8 apresentaram excelente atividade sobre tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* sendo mais ativos do que IBEs de referência: **Cz** e **Pz**. Dois compostos (**2035** e **2035HCl**) foram mais ativos que os nitroimidazóis de referência: **Mg** e **Bz**. Resultados com amastigotas intracelulares sugerem que o tratamento com o composto **1947HCl** diminui o IE em todas as condições testadas. Nos ensaios com a cepa Tulahuen os compostos **2033** e **2035** foram os mais ativos sobre o parasito.
- A maior parte dos compostos foi mais tóxica sobre o parasito do que sobre macrófagos peritoneais, com exceção as drogas **1948HCl** e **1949HCl**. O composto **1947HCl** foi o mais seletivo da série, sendo esse pouco tóxico em macrófagos peritoneais e cardiomiócitos;
- A inserção do átomo de cloro aumentou a atividade tripanocida dos compostos **1947** e **2035**. As estrutura química das drogas menos ativas indicam que a presença do radical protetor é fundamental para a manutenção da atividade da droga sobre o parasito, assim como a subunidade 1,3,4-tiadiazólica.
- Com relação ao mecanismo de ação da droga **1947HCl** foi possível observar na análise ultraestrutural a formação de “blebs” de membrana do corpo e do flagelo; alterações no formato do cinetoplasto; arredondamento e perda do flagelo nos parasitos tratados com essa droga. Já os resultados da citometria indicam não haver aumento na geração de ROS; dano de membrana plasmática nos parasitos tratados e perda do potencial de ação de membrana mitocondrial;

4. REFERÊNCIAS

BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Current molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 510–8, 2008.

BUSCHINI, A. et al. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 10, p. 1537–1547, 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1909.

CLAYTON, J. Chagas disease: Pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301 SUPPL. p. 12–15, 2010.

PINTO DIAS, J. C. Human chagas disease and migration in the context of globalization: Some particular aspects. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, 2013.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for chagas disease chemotherapy - A proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549–554, 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**: v. 465, p. 6-7, 2010.

DE CARVALHO, A. S. et al. Megazol and its bioisostere 4h-1,2,4-triazole: Comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their in vitro and in silico interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 315–323, 2014.

DE CASTRO, S. L., MEIRELLES, M. DE N. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivate upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n.1, p. 95-9, 1990.

DE NOYA, B. A.; GONZÁLEZ, O. N. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. **Acta tropica**, v. 151, p. 94-102, 2015.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 89–100, 2009.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 83–84, 2006.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. DE A. Artigo de Opinião / Opinion Article Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375–379, 2011.

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

DOCAMPO, R. EI1 BI 1. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 19, n. 1, p. 317–321, 1979.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2005.

ESPINOZA, B. et al. Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi i strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 76, p. 293-7, 1982.

GASPAR, L., et al. Current and Future Chemotherapy for Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, V. 22, n. 37, p. 4293-31, 2015.

GAUNT, M. W., et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, p. 936-939, 2003.

GILLIS, E. P. et al. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 8315–8359, 2015.

GURGEL, C. B. F. M., et al. A doença de Chagas no Brasil: uma presença antiga. **Revista Sociedade Brasileira Clínica Médica**, v. 5, p. 196-202, 2009.

HARGROVE, T. Y. et al. Complexes of *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) with Two Pyridine-based Drug Candidates for Chagas Disease: Structural basis for pathogen selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 44, p. 31602–31615, 2013.

HIGUCHI, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, n. 1, p. 96–107, 2003.

HOTEZ, P. J. et al. An Unfolding Tragedy of Chagas Disease in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 5–8, 2013.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. 69–75, 2010.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. Suppl. I, p. 95–7, 2007.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 1-18, 2011.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 65–87, 2011.

MAYA, J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: Effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 999–1006, 2003.

MEIRELLES M.N.L. et al. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. **European Journal Cell Biology**, v. 41, n. 2, p. 198-206, 1986.

MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 252–260, 2004.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, 2009.

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

MOLINA, J. et al. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 150–155, 2000.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 8, p. 663–677, 2006.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional Control of transfusional transmission. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. Tabela 1, p. 64–67, 2011.

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

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

NESSLANY, F. et al. In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megalozol. **Mutation Research**, v. 560, n. 2, p. 147–158, 2004.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: Adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, 2009.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

PÉREZ-AYALA, A., et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n. 7, p.1108-1113, 2011.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: Epidemiology, clinical presentation and treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 3, p. 263–274, 2012.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, 2010.

PINTO DIAS, J. C. Human chagas disease and migration in the context of globalization: Some particular aspects. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, 2013.

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

POLI, P. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of megalozol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1617–1627, 2002.

RASSI JR. A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clin. Cardiology**, v. 23, p. 883–889, 2000.

RASSI, A.; RASSI JR., A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; RASSI, JR., A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 152–158, 2009.

REGINA, V. et al. Acute Chagas disease in the state of Pará , Amazon Region : is it increasing ? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. 2–7, 2018.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 233–238, 2010.

SALOMÃO, K. et al. In Vitro and in Vivo activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megalol against trypanosoma cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2023–2031, 2010.

SALOMÃO, K.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. Stairway to Heaven or Hell? Perspectives and Limitations of Chagas Disease Chemotherapy. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 20, p. 2266–89, 2016.

SALVATELLA, R. Andean subregional Chagas disease area and the Andean initiative of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 39–40, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SOUZA, W. DE. Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 313–325, 2008.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

TARLETON, R. L. Chagas disease: A role for autoimmunity? **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 10, p. 447–451, 2003.

URBINA, J. A. et al. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In vitro and in vivo studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1771–1777, 1998.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 62, n. 1, p.149-156, 2010.

VIODÉ, C. ÉCILE et al. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 549–557, 1999.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>, Acesso em: 15 de abril de 2018.

YASUKAWA, K. Blood donor screening for *Trypanosoma cruzi* infection in Japan. **Transfusion**, v. 54, n. 3, p. 745–746, 2014.

YUN, O. et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year experience of Médecins Sans Frontières. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. 1–8, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.