

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MONIQUE DIAS BENEDETTI**

**AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS DE METRONIDAZOL NO TRATAMENTO DA DOENÇA  
DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

**Alfenas/MG**

**2022**

MONIQUE DIAS BENEDETTI

AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS DE METRONIDAZOL NO TRATAMENTO DA DOENÇA  
DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Santana Caldas  
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Benedetti, Monique Dias.

Avaliação de híbridos de metronidazol no tratamento da doença de Chagas experimental / Monique Dias Benedetti. - Alfenas, MG, 2022.  
88 f. : il. -

Orientador(a): Ivo Santana Caldas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Benznidazol. 2. Derivados de eugenol. 3. Hibridização molecular. 4. Terapia combinada. 5. Trypanosoma cruzi. I. Caldas, Ivo Santana, orient. II. Título.

AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS DE METRONIDAZOL NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 23 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Usha Vashist  
Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - IFSULDEMINAS

Profa. Dra. Fabiane Matos dos Santos  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo - Ufes



Documento assinado eletronicamente por **Ivo Santana Caldas, Professor do Magistério Superior**, em 20/09/2022, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiane Matos dos Santos, Usuário Externo**, em 20/09/2022, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Usha Vashist, Usuário Externo**, em 21/09/2022, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0819950** e o código CRC **32FE6215**.

Dedico este trabalho a Deus, meus pais e meu namorado por toda força que me deram e por sempre acreditarem em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e coragem para continuar mesmo em meio aos momentos mais desafiadores.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivo Santana Caldas pela oportunidade de orientação, pela paciência, dedicação, pelo investimento de tempo, pela preocupação e por todo apoio e conhecimento adquirido durante este período. Sou extremamente grata a tudo o que fez por mim no decorrer destes dois anos, obrigada por ter acreditado em meu potencial.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco pela oportunidade de orientação, fornecimento dos híbridos junto aos demais colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (UNIFAL-MG), pelo investimento na realização desta pesquisa e dedicação.

Aos meus colaboradores Me. Elda Gonçalves dos Santos, Mônica Fraccarolli Pelozo, Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia de Figueiredo Diniz Castro, Prof. Dr. Sérgio Caldas e Luana Sueli Silva por toda a ajuda e apoio no decorrer deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Usha Vashist por ter acreditado em meu potencial, por ter me ajudado no encaminhamento ao mestrado e ter aceitado o convite para compor minha banca examinadora, minha imensa gratidão e admiração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Matos dos Santos por ter aceito o convite de compor a banca examinadora desde a qualificação, e que vem contribuindo grandemente para esta pesquisa.

À Dr<sup>a</sup>. Laiane Corsini Rocha, Dr. Matheus Pereira de Araújo e Me. Maria Ângela Rodrigues técnicos do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG, por todos o apoio e ensinamentos.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, em especial à Gislaine Scodeler e Rafaela Bruzadelli, amigas que compartilhei os momentos do mestrado e que levarei para a vida.

A minha família que tanto me apoiou e me estimulou, especialmente a minha mãe Sirlene de Souza Dias, a qual não tenho palavras para descrever todo amor e admiração, obrigada por ser meu maior exemplo e fonte de estímulo, dedicação e amor infinito. E ao meu pai Wagner Benedito Benedetti pelo estímulo, por acreditar em mim e por todo amor, essa vitória também é de vocês.

Ao meu namorado Luiz Fernando Ferreira, que tanto me apoiou e acompanhou cada passo do desenvolvimento desde mestrado, muito obrigada pela paciência, estímulo, dedicação, amor e por ter acreditado mais em mim do que eu mesma.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e todos os professores e pessoas que se dedicam todos os dias para que o mesmo aconteça, meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A doença de Chagas possui como um de seus principais desafios o desenvolvimento de um fármaco que seja efetivo em todas as fases da doença e com baixa toxicidade, uma vez que os atuais não suprem essas necessidades. Uma das estratégias de planejamento de fármacos, é a hibridização molecular, que pode reduzir os efeitos colaterais e melhorar a afinidade e eficácia em relação aos compostos isolados. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*T. cruzi* de novos compostos híbridos de metronidazol acoplados com derivados de eugenol com testes *in vitro* e *in vivo*. Previamente a este trabalho, 21 compostos foram avaliados em testes *in vitro* frente às formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* para avaliação da eficácia contra o parasito (definição do IC<sub>50</sub>) e toxicidade dos compostos (CC<sub>50</sub>). Os três compostos com melhores resultados no experimento *in vitro* (CEI02, CEF05 e MG02), foram testados em experimento de triagem *in vivo* para definição do composto com melhor atividade, menor toxicidade e a dosagem mais otimizada do mesmo, em experimento de maior duração e em terapia combinada com Bz, além disso, CEF05 foi testado contra formas amastigotas. Neste experimento final, foram avaliados parâmetros de eficácia terapêutica, biológicos, imunológicos e histológicos. Os resultados obtidos a partir dos testes *in vitro* demonstram que todos os compostos apresentaram atividade tripanocida contra o parasito e apresentaram satisfatório grau de toxicidade, sendo MG02 o composto mais satisfatório. Na triagem *in vivo* foi demonstrado que o melhor resultado na redução da parasitemia foi o do híbrido CEF05 nas dosagens de 50 e 100mg/kg, que foi o único a prevenir a morte de todos os animais e com menor perda de peso. Foi possível observar, a partir do resultado do experimento *in vitro* contra formas amastigotas que o híbrido apresentou resultados superiores ao benznidazol. A partir dos resultados do experimento *in vivo* final, a monoterapia de CEF05 não eliminou o *T. cruzi* dos hospedeiros, porém reduziu a parasitemia dos animais, evitou a mortalidade, reduziu a perda peso dos animais e reduziu os infiltrados inflamatórios do coração dos camundongos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de potencializar o efeito tripanocida do Bz verificado através da parasitemia. Com os resultados obtidos, é possível concluir que apesar de a maior atividade nos testes *in vitro* ter sido observada com a utilização do MG02, melhores resultados foram observados *in vivo* com a utilização do híbrido CEF05 que se destacou pela maior atividade contra *T. cruzi* e redução dos efeitos tóxicos.

Palavras-chave: Benznidazol. Derivados de eugenol. Hibridização molecular. Terapia combinada. *Trypanosoma cruzi*.



## ABSTRACT

Chagas' disease has as one of its main challenges the development of a drug that may be effective in all stages of the disease and with low toxicity since the current ones do not meet these needs. One of the drug design strategies is molecular hybridization, which enables the reduction of side effects and improve affinity and efficacy with concerning to isolated compounds. Thus, the objective of this work was to evaluate the anti-*T. cruzi* efficacy of new hybrid metronidazole compounds coupled with eugenol derivatives with *in vitro* and *in vivo* tests. Previous worked tested *in vitro* the anti-*T. cruzi* efficacy and the toxicity of 21 compounds evaluated Against both epimastigote and trypomastigote forms of the parasite to mesuare the efficacy (definition of IC<sub>50</sub>) and toxicity of the compounds (CC<sub>50</sub>). The three compounds with the best results in the *in vitro* experiment (CEI02, CEF05, and MG02) were tested in an *in vivo* screening experiment to define the compound with the best activity, lowest toxicity, and the most optimized dosage of the same, in an experiment of longer duration and combination therapy with Bz, in addition, CEF05 was tested against amastigote forms. In this final experiment, biological, immunological, and histological parameters of therapeutic efficacy were evaluated. The results obtained from the *in vitro* tests demonstrate that all compounds showed trypanocidal activity against the parasite and presented a satisfactory degree of toxicity, with MG02 being the most satisfactory compound. *In vivo* screening showed that the best result in reducing parasitemia was the hybrid CEF05 at dosages of 50 and 100mg/kg, which was the only one to prevent the death of all animals and with less weight loss. It was possible to observe, from the results of the *in vitro* experiment against amastigote forms, that the hybrid presented superior results to benznidazole. From the results of the "definitive" *in vivo* experiment, CEF05 monotherapy did not eliminate *T. cruzi* from the hosts, but it reduced the parasitemia, avoided mortality, reduced the animals' weight loss, and reduced the heart inflammatory infiltrates and the production of pro-inflammatory cytokines. In addition, the potentiating of trypanicidal effect of Bz, verified through parasitemia. With the results obtained, it is possible to conclude that although the highest activity in the *in vitro* tests was observed with the use of MG02, better results were observed *in vivo* with the use of the hybrid CEF05, which stood out for its greater activity against *T. cruzi* and reduction of toxic effects.

Keywords: Benznidazole. Combined therapy. Eugenol derivatives. Molecular hybridization. *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do fármaco benznidazol.....	31
Figura 2 -	Estrutura química do composto CEI02.....	32
Figura 3 -	Estrutura química do composto MG02.....	32
Figura 4 -	Estrutura química do composto CEF05.....	32
Figura 5 -	Curvas padrão e de dissociação geradas a partir de DNA de epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> com o DNA genômico de tecido cardíaco de animais não infectados.....	44
Figura 6 -	Curva de parasitemia dos animais tratados com CEI02, CEF05 e MG02 em três dosagens diferentes e comparados ao grupo controle.....	51
Figura 7 -	Gráficos da mortalidade de cada grupo experimental avaliada até o 40º dia após infecção por cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	53
Figura 8 -	Alteração do peso médio dos animais infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com CEI02, CEF05 e MG02 durante o experimento.....	54
Figura 9 -	Curva de parasitemia dos animais tratados com monoterapia de CEF05 e combinado com benznidazol em comparação ao grupo controle positivo.....	59
Figura 10 -	Resultados da PCR quantitativa em tempo real em tecidos cardíacos de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.....	63
Figura 11 -	Alteração do peso médio dos animais infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com CEF05 em monoterapia e em combinação com Bz durante o experimento.....	64
Figura 12 -	Avaliação dos níveis de apatia e pelos eriçados dos grupos de camundongos utilizados no experimento.....	66
Figura 13 -	Peso médio dos órgãos em relação ao peso médio corporal dos camundongos não infectados e infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada .....	68
Figura 14 -	Análise quantitativa dos infiltrados inflamatórios do coração de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.....	70

Figura 15 -	Secções do coração de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.....	71
Figura 16 -	Dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.....	74
Figura 17 -	Dosagem de anticorpos da classe IgG total e subclasse IgG1 através do teste ELISA de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais da triagem <i>in vivo</i> com seus respectivos tratamentos e dosagens.....	38
Tabela 2 -	Divisão dos grupos experimentais do experimento <i>in vivo</i> final com seus respectivos tratamentos.....	40
Tabela 3 -	Valores de IC <sub>50</sub> , CC <sub>50</sub> e IS, obtidos a partir dos experimentos <i>in vitro</i> , utilizando os tratamentos contra a forma epimastigota de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	50
Tabela 4 -	Valores de IC <sub>50</sub> , CC <sub>50</sub> e IS, do composto e fármaco isolados e hibridizados, obtidos a partir dos experimentos <i>in vitro</i> , utilizando os tratamentos contra a forma epimastigota de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	55
Tabela 5 -	Resultados do ensaio <i>in vitro</i> utilizando amastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	57
Tabela 6 -	Controle de cura dos animais infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com monoterapia de CEF05 ou Bz e em combinação.....	60
Tabela 7 -	Principais resultados compilados do experimento <i>in vivo</i> final.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
Bz	Benznidazol
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica para 50% das células
CEF05	Híbrido de metronidazol acoplado ao diidroeuogenol nitrado na posição 5
CEI02	Diidroeuogenol
Dch	Doença de Chagas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória do composto/fármaco capaz de matar 50% dos parasitos
IFN- $\gamma$	Interferon gama
LIT	Liver infusion tryptose
MG02	Mistura física de metronidazol com eugenol (não hibridizados)
Nif	Nifurtimox
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	A DOENÇA DE CHAGAS E SEU AGENTE ETIOLÓGICO <i>T. cruzi</i> .....	17
2.2	EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE.....	21
2.3	QUIMIOTERAPIAS DE REFERÊNCIA.....	23
2.4	QUIMIOTERAPIAS ALTERNATIVAS.....	25
<b>2.4.1</b>	<b>Metronidazol.....</b>	<b>26</b>
2.5	HÍBRIDOS E TERAPIA COMBINADA.....	28
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
5.1	PARASITO.....	31
5.2	FÁRMACO E COMPOSTOS.....	31
5.3	EXPERIMENTOS <i>in vitro</i> .....	33
<b>5.3.1</b>	<b>Atividade contra formas epimastigotas.....</b>	<b>33</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Atividade contra formas tripomastigotas.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Atividade contra formas amastigotas.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Citotoxicidade.....</b>	<b>36</b>
5.4	EXPERIMENTOS <i>in vivo</i> .....	37
<b>5.4.1</b>	<b>Triagem <i>in vivo</i>.....</b>	<b>37</b>
5.4.1.1	Animais.....	37
5.4.1.2	Infecção, tratamento, parasitemia e parâmetros biológicos.....	37
<b>5.4.2</b>	<b>Experimento final.....</b>	<b>39</b>
5.4.2.1	Animais.....	39
5.4.2.2	Infecção e tratamento.....	39

5.4.2.3	Parasitemia e parâmetros biológicos.....	40
5.4.2.4	Necropsia.....	40
5.4.2.4.1	<i>Peso dos órgãos</i> .....	41
5.4.2.4.2	<i>Histologia</i> .....	41
5.4.2.5	Avaliação da eficácia terapêutica.....	42
5.4.2.5.1	<i>Exame de sangue a fresco</i> .....	42
5.4.2.5.2	<i>Hemocultura</i> .....	42
5.4.2.5.3	<i>PCR quantitativa em tempo real</i> .....	43
5.4.2.6	<i>Alterações comportamentais, na pelagem e de peso nos camundongos</i>	45
5.4.2.7	Avaliação imunológica.....	46
5.4.2.7.1	<i>IgG Total e IgG 1</i> .....	46
5.4.2.7.2	<i>Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória</i> .....	47
5.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS TRATAMENTOS <i>in vitro</i> CONTRA AS FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA Y DE <i>T. cruzi</i> .....	49
6.2	RESULTADOS DA TRIAGEM <i>in vivo</i> .....	50
6.2.1	<b>Avaliação da atividade anti-<i>T. cruzi</i> dos compostos em modelos murinos através da curva de parasitemia</b> .....	<b>50</b>
6.2.2	<b>Avaliação da tolerabilidade dos compostos pelos camundongos</b> ....	<b>52</b>
6.3	AVALIAÇÃO MAIS APROFUNDADA DO COMPOSTO CEF05.....	54
6.3.1	<b>Resultados <i>in vitro</i> do composto e do fármaco não hibridizados</b> .....	<b>55</b>
6.3.2	<b>O composto CEF05 reduz o número de células infectadas com as formas amastigotas e a média de parasitos por célula</b> .....	<b>55</b>
6.4	RESULTADOS DO EXPERIMENTO <i>in vivo</i> FINAL.....	57
6.4.1	<b>O híbrido CEF05 reduz a parasitemia e aumenta a atividade tripanocida do benznidazol em terapia combinada</b> .....	<b>57</b>
6.4.2	<b>Avaliação do controle de cura</b> .....	<b>59</b>
6.4.2.1	PCR quantitativa em tempo real.....	62
6.4.3	<b>Tolerância dos animais ao híbrido CEF05 e benznidazol em</b>	

	monoterapia e em terapia combinada.....	63
6.4.4	Análises morfométricas dos órgãos.....	67
6.4.5	Análise dos infiltrados inflamatórios do coração.....	69
6.4.6	Avaliação da dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória.....	72
6.4.7	Dosagem de IgG total e IgG1.....	75
6.4.8	Principais resultados do experimento <i>in vivo</i> final compilados.....	77
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82



## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DCh) humana também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta e descrita pelo médico sanitário Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909 e tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909).

Estima-se que atualmente de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* em todo o mundo, mas principalmente na América Latina onde a doença é endêmica, portanto, é um importante problema de saúde pública (WHO, 2020). No Brasil, entre as doenças tropicais negligenciadas (DTNs), a que mais causou óbitos entre 2000 e 2011 foi a doença de Chagas, seguida de esquistossomose e leishmaniose. A DCh recebeu a designação de a mais negligenciada entre as DTNs (MARTINS-MELO *et al.*, 2016; TARLETON; CURRAN, 2012).

A expansão da DCh ocorreu em decorrência da adaptação dos triatomíneos ao domicílio humano que foi causada pelo desmatamento de florestas para agricultura extensiva e pecuária que ocorreu na América Latina. Os triatomíneos que não conseguiam se alimentar devido ao deslocamento da fauna selvagem precisaram colonizar áreas habitadas por humanos, se adaptaram a esse novo nicho e passaram a se alimentar do sangue de humanos e animais domésticos, resultando em uma zoonose (COURA, 2007; COURA, 2003).

A doença possui diversas formas de transmissão, dentre elas temos transmissão oral e por leite materno, congênita, transfusão sanguínea, acidentes de laboratório, via sexual, transplante de órgãos e a transmissão vetorial, que possui a maior importância epidemiológica (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011; NEVES *et al.*, 2005). Com a mobilidade populacional humana, o padrão epidemiológico da doença também mudou nas últimas décadas, saindo de uma doença rural para principalmente urbana e emigrando para outros países onde o aumento do número de casos foi perceptível como Estados Unidos, Canadá, em muitos países europeus, alguns africanos, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental (WHO, 2020).

Para o tratamento da doença em humanos, benznidazol e nifurtimox são os dois compostos utilizados atualmente no mundo, são eficazes na fase aguda, infecção congênita, infecção acidental e infecção crônica recente. Entretanto, apresentam diversos efeitos colaterais, os mais frequentes com o tratamento de nifurtimox são:

anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas como náuseas e vômitos. Já com o benznidazol os efeitos colaterais mais comumente relatados são: sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado, linfadenopatia, dor articular e muscular, depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica, agranulocitose (complicação mais séria), polineuropatia, parestesia e neuropatia periférica (COURA; CASTRO, 2002).

Mesmo após quase cinco décadas da introdução do nifurtimox e benznidazol no tratamento da enfermidade, esses ainda são os únicos fármacos disponíveis para o tratamento em humanos. A utilização do nifurtimox foi descontinuada no Brasil, sendo atualmente o benznidazol produzido e distribuído pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, já que a patente do medicamento foi doada ao Ministério Público no ano de 2003 (MAZZETI; DINIZ; BAHIA, 2014; BRASIL, 2003).

Metronidazol é um agente antibacteriano e antiparasitário sintético da classe dos nitroimidazóis que é usado há mais de 35 anos na prática clínica. Inicialmente era utilizado para o tratamento da infecção por *Trichomonas vaginalis*, entretanto hoje é utilizado no tratamento de diversas infecções como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Helicobacter pylori*, vaginose bacteriana, doença de Crohn e no tratamento de infecções bacterianas anaeróbicas (BENDESKY; MENÉNDEZ, 2001).

Em busca de novos tratamentos para a doença de Chagas, diferentes estratégias terapêuticas têm sido utilizadas, como identificação de novos medicamentos, reposicionamento dos fármacos e terapias combinadas. As terapias combinadas têm sido cada vez mais usadas, uma vez que aumenta a eficácia e tolerância do fármaco. Quando usada a combinação de medicamento de classes químicas diferentes, pode haver a redução tanto da dosagem quanto do tempo de tratamento, o que resulta em menos efeitos colaterais e na possibilidade de diminuição nos custos do tratamento (BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura abordará tópicos relacionados a conhecimentos gerais sobre a doença de Chagas e seu agente etiológico *T.cruzi*, as quimioterapias atuais utilizadas em humanos, quimioterapias alternativas já testadas, e as vantagens da utilização de novas abordagens no tratamento da doença como a hibridização molecular e terapia combinada, a fim de permitir uma melhor compreensão a respeito do tema.

### 2.1 A DOENÇA DE CHAGAS E SEU AGENTE ETIOLÓGICO *T.cruzi*

Em 1909 quando o médico sanitarista e pesquisador Carlos Chagas descobriu e descreveu em Lassance, Minas Gerais, a doença de Chagas, foi a primeira vez na história da medicina que o mesmo pesquisador teria identificado o vetor (triatomíneos), o agente etiológico (o protozoário *T.cruzi*) e a doença causada pelo mesmo, nesta ordem, diferentemente da ordem habitual das descobertas de doenças, onde costuma-se primeiro identificar a doença, após o agente etiológico e por último o vetor (CHAGAS, 1909; KROPF; AZEVEDO; FERREIRA, 2000).

*T.cruzi* é pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao subgênero Schizotrypanum. Os protozoários desta ordem possuem uma estrutura chamada cinetoplasto, organela que concentra o DNA mitocondrial (SOUZA; VIDAL, 2017). O *T. cruzi* passa por transformações biológicas (formas evolutivas) com alterações estruturais e metabólicas para se adaptar aos diferentes micro ambientes internos dos seus hospedeiros, o que possibilita a viabilidade da infecção (VICKERMAN, 1985).

As formas evolutivas do parasito podem ser identificadas pela emergência do flagelo e pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, sendo as formas: (i) **Tripomastigotas** possuem forma alongada, com flagelo ondulante e livre na porção anterior da célula, que caracteriza-se por apresentar seu cinetoplasto posterior ao núcleo; (ii) **Amastigotas** têm formato arredondado, o flagelo é curto e não exteriorizado; e (iii) **Epimastigotas** que se caracterizam por forma alongada, cinetoplasto justanuclear que se localiza de forma anterior ao núcleo e possuem uma pequena membrana ondulante disposta de forma na lateral (NEVES *et al.*, 2005). Seu ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros de sete ordens de

mamíferos, assim como o homem e pelos triatomíneos, principalmente dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (COURA, 2003).

O ciclo do parasito nos hospedeiros vertebrados se inicia quando o triatomíneo ao fazer o repasto sanguíneo no mamífero, elimina suas excretas contaminadas com tripomastigotas metacíclicos e a infecção ocorre quando são introduzidas as excretas no orifício da picada ou em mucosas. A forma tripomastigota metacíclica é capaz de invadir várias células nucleadas do hospedeiro como as do coração. No interior das células os parasitos passam a ter a forma amastigota, que se multiplicam por divisão binária. Quando as células estão cheias de parasitos, eles passam para a forma de tripomastigotas sanguíneos, que a partir da ruptura das células hospedeiras, se disseminam pela corrente sanguínea onde poderão infectar novos tecidos e órgãos (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003).

Já nos hospedeiros invertebrados, se o mamífero que possui DCh for picado por outro triatomíneo, o parasito poderá ser transmitido ao inseto. No intestino do inseto os tripomastigotas evoluem para a forma epimastigota, se multiplicam e voltam a se diferenciar em tripomastigota metacíclicos (forma infectante) que são eliminados junto às excretas do triatomíneo (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003).

As formas de transmissão da DCh ocorrem via vetorial, transfusão sanguínea, congênita (da mãe infectada ao filho), oral, sexual, acidentes laboratoriais e transplante de órgãos (NEVES *et al.*, 2005). Em qualquer uma das vias de transmissão, os indivíduos infectados podem apresentar febre, palidez, cefaleia, aumento dos gânglios linfáticos, dores musculares, inchaço, dificuldade de respirar, além de dor torácica ou abdominal (WHO, 2018).

A transmissão por via vetorial ocorre por triatomíneos que são insetos pertencentes a família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como "barbeiros", que após o repasto sanguíneo, costumam defecar ao lado da picada, eliminando dessa forma junto às fezes as formas infectantes do parasito, ao coçar o local o homem carrega as excretas com o *T. cruzi* até o orifício da picada ou mucosas (GALVÃO, 2003).

Este tipo de transmissão ainda é responsável por 70% dos casos nos países que não há controle de vetores (COURA; DIAS, 2009). Os primeiros sinais visíveis e característicos que em parte dos casos podem ser percebidos quando há a transmissão vetorial são: Sinal de Romaña e chagoma de inoculação, ambos podem

ajudar no diagnóstico de novos infectados (WHO, 2018). O Sinal de Romaña é caracterizado pelo inchaço inflamatório das pálpebras de forma unilateral e bipalpebral, após o contato da conjuntiva com as excretas contaminadas do triatomíneo (ROMAÑA, 1935).

Atualmente no Brasil a forma de transmissão mais recorrente é a por via oral (DE NOYA; GONZÁLEZ, 2015; COURA; JUNQUEIRA, 2012). Assim como na Venezuela, Guiana Francesa, Colômbia e Bolívia. Enquanto a transmissão vetorial está associada à pobreza, a transmissão por via oral independe da classe social e é toda endêmica da população continental (DE NOYA; GONZÁLEZ, 2015).

Em relação a transmissão oral em humanos, as formas de transmissão podem ser através: ingestão do leite materno, quando a mãe está infectada, ingestão de sangue ou carne mal cozida de mamíferos infectados (e principalmente de reservatórios silvestres), acidentes de laboratório ou através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com fezes ou urina de triatomíneos ou marsupiais infectados (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011). Há um risco particular quando se trata de transmissão oral, no caso do consumo do açaí, a transmissão pode ocorrer quando este é prensado a noite, os triatomíneos são atraídos pelas luzes ligadas, caem e são moídos pela máquina, aqueles que consomem o açaí onde foram triturados insetos infectados, adquirem a doença (VALENTE; NETO, 1999).

Segundo Dias *et al.* (2015), é possível identificar dois tipos de surtos que variam de acordo com o local em que ocorrem: urbanos e rurais. Os surtos urbanos são decorrentes do consumo de açaí semi-industrializados e comercializados, o que demonstra inadequado controle de vigilância sanitária. Já nos surtos rurais pode-se identificar vários tipos de alimentos elaborados de forma artesanal, produzidos por famílias ou com pessoas da mesma rede social, gerando um acometimento local. Segundo Pacheco *et al.* (2021) o açaí é o principal alimento fonte de contaminação oral, seu consumo quando contaminado é responsável por diversos surtos, principalmente na região do Pará e região amazônica.

Assim como no consumo do açaí, a contaminação oral pelo consumo de cana-de-açúcar também está associada a contaminação da moagem da cana por triatomíneos infectados que são atraídos pela iluminação artificial, o que pode também desencadear surtos da doença (BASTOS *et al.*, 2010; VARGAS *et al.*, 2018), além disso, com frequência no Brasil o caldo de cana é consumido sem inspeção da

vigilância sanitária e o caldo não costuma passar por nenhum processo de pasteurização ou qualquer processo industrial que possa impedir dos parasitos sobreviverem.

A doença pode apresentar-se em duas fases, sendo a aguda com duração de cerca de dois meses após a pessoa ter sido infectado e a crônica, que dura por toda a vida, não tendo sido observada cura espontânea na DCh (WHO, 2018). Durante a fase aguda o número de parasitos circulantes na corrente sanguínea é elevado. A manifestação mais característica é febre constante, onde inicialmente é bastante elevada (de 38,5 a 39°C), pode durar até 12 semanas e desaparecer espontaneamente, evoluindo para a fase crônica ou em casos clínicos mais graves, pode evoluir para morte. Entretanto, na maioria dos casos não há sintomas na fase aguda, ou quando há, são leves e inespecíficos quando não associados a surtos agudos e transmissão oral (BRASIL, 2019; WHO, 2018).

Após dois ou três meses de fase aguda, inicia-se a fase crônica, nela os parasitos que antes apresentavam-se em abundância na corrente sanguínea e nos tecidos, agora se encontram de forma restrita, mas permanecem se multiplicando e agindo de forma patogênica por muito tempo. A fase crônica é no início geralmente assintomática, onde o eletrocardiograma e exame radiológico do coração, esôfago e cólon não apresentam anormalidades, o que foi descrito como a “fase crônica indeterminada” por Carlos Chagas (CHAGAS, 1916; COURA; BORGES-PEREIRA, 2011).

A fase crônica pode variar desde a forma indeterminada onde há ausência de sinais e sintomas, até casos mais graves que podem resultar em manifestações diversas como patologias cardíacas, no trato gastrointestinal (megaesôfago e megacólon principalmente), cardiodigestiva (também conhecida como forma mista, onde há manifestações tanto gastrointestinais quanto cardíacas), além de poder causar distúrbios neurológicos (RASSI JR; RASSI; MARTIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; VIOTTI; SEGURA, 2009).

Quanto aos pacientes que evoluem para a fase crônica sintomática, que ocorre entre 5 a 30 anos após a infecção, cerca de 20% a 40% desenvolvem a forma cardíaca crônica da doença e 15% a forma digestiva (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017).

A infecção crônica pode levar a morte súbita nos anos posteriores, sendo as principais causas a arritmia cardíaca ou a insuficiência cardíaca, que ocorrem devido a destruição do músculo cardíaco e de seu sistema nervoso (WHO, 2018). Na forma crônica cardíaca o envolvimento com o coração é o principal aspecto da doença de Chagas em razão de suas características, frequência e consequências. Os pacientes com essa forma da doença podem apresentar alterações no eletrocardiograma, alta frequência de arritmias, taquicardia ventricular, bradicardia, edema e morte súbita. Quadros de insuficiência cardíaca ou estágios avançados de cardiomiopatia em pacientes chagásicos, não possuem um bom prognóstico, o que é semelhante ao prognóstico de pacientes que sofrem com insuficiência cardíaca por outras causas que não seja a DCh (PRATA, 2001; RASSI JR *et al.*, 2006; VIOTTI *et al.*, 2005).

Na forma digestiva (gastrointestinal) os principais órgãos acometidos são esôfago e cólon. Os pacientes chagásicos com esta forma da doença podem apresentar o desenvolvimento de alterações de motilidade, secreção e absorção no trato digestivo, além de trânsito lento, dificuldade de esvaziamento, que se segue para o aumento do calibre desses órgãos (megacólon e megaesôfago). No megaesôfago e megacólon sempre ocorre algum grau de destruição do sistema nervoso autônomo, o que se suspeita preceder as mudanças na motilidade (PRATA, 2001).

Em relação à forma cardiodigestiva (mista), nos pacientes que possuem esta forma da doença é possível observar alterações tanto cardíacas quanto digestivas (RASSI JR; RASSI; MARTIN-NETO, 2010). O diagnóstico da DCh na fase crônica é feito a partir principalmente de testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde de 6 a 7 milhões de pessoas em todo mundo estão infectadas pelo *T. cruzi*, a doença é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2020).

O padrão epidemiológico da DCh mudou nas últimas décadas, deixou de se restringir apenas às regiões rurais das Américas, passando a ser predominantemente urbana e estendendo-se principalmente de 42° ao norte dos Estados Unidos até 43° ao sul da Argentina. Porém, é possível ser encontrada em outros países como países da Europa, alguns países da África, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental, os

mesmos tiveram um crescente número de casos nos últimos anos. Os principais motivos de tamanha disseminação são devido a mobilidade populacional, urbanização e emigração, o que faz com que o número de pessoas com risco de infecção cresça cada vez mais, cerca de 75 milhões de pessoas pertencem a este grupo atualmente (WHO, 2018; MANDAL, 2014; WHO, 2020).

A expansão da DCh ocorreu em decorrência da adaptação dos triatomíneos ao domicílio humano que foi causada pelo desmatamento de florestas para agricultura extensiva e pecuária que ocorreu nas últimas duas a três décadas na América Latina, os triatomíneos que não conseguiam se alimentar devido ao deslocamento da fauna selvagem precisaram colonizar áreas habitadas por humanos, se adaptaram a esse novo nicho e passaram a se alimentar do sangue de humanos e animais domésticos, resultando em uma zoonose (COURA, 2007; COURA, 2003).

Os insetos vetores podem por exemplo habitar fendas de casas mal construídas, principalmente as localizadas nas áreas rurais (como é o caso das casas de taipa), os triatomíneos emergem durante a noite para se alimentarem de sangue, o que facilita a transmissão. A DCh recebe a designação de doença tropical negligenciada, pois sua propagação ocorre de forma mais recorrente e desproporcional em populações vulneráveis e residentes em áreas rurais e imigrantes, além de ser predominante em países em desenvolvimento (MANDAL, 2014; APT *et al.*, 2013; TARLETON; CURRAN, 2012).

Durante as últimas três décadas houveram várias melhorias no que diz respeito ao controle e gestão da DCh, a partir da triagem de doadores de sangue e programas de controle dos vetores foi reduzida a incidência e prevalência da doença (RASSI JR; RASSI; MARTIN-NETO, 2010). Como é possível perceber comparando os dados de 2003 onde o número de infectados era estimado entre 16 a 18 milhões de pessoas apenas na América Latina, e os dados de 2020 que apontam de 6 a 7 milhões de infectados em todo o mundo, indicando assim uma redução significativa no número de casos nas últimas décadas (COURA, 2003; WHO, 2020). Ainda assim, são milhões de pessoas infectadas e milhares de novos casos a cada ano (SOSA-ESTANI; VIOTTI; SEGURA, 2009).

Não existem vacinas, e devido ao grande reservatório de *T. cruzi* em animais selvagens das Américas, o parasito não pode ser erradicado. Em vez disso, as formas de controle e prevenção são pulverização periódica de inseticida nas casas, na



tentativa de deter a infestação dos vetores triatomíneos (principal forma de controle), melhorias e limpeza de domicílios, uso de mosquiteiros, rigor na higiene e manipulação de alimentos, triagem de doadores de sangue e de recém nascidos de mães infectadas, teste para doadores de órgãos e acesso ao diagnóstico e tratamento adequados aos já infectados (WHO, 2018; TARLETON; CURRAN, 2012).

No Brasil, houve a interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans*, entretanto, quatro outras espécies de triatomíneos têm importância especial no que diz respeito à transmissão da doença ao ser humano, são elas: *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida* e *Triatoma pseudomaculata* (BRASIL, 2019).

### 2.3 QUIMIOTERAPIAS DE REFERÊNCIA

Entre os anos de 1940 a 1980 a maioria dos agentes quimioterápicos começaram a adentrar a terapêutica clínica, alguns deles já eram conhecidos muitos séculos atrás (SILVA, 2002). Na década de 1970 foram descobertos e descritos os medicamentos benznidazol (Bz) e nifurtimox (Nif) a partir de testes em modelos murinos, o que representou um grande marco no que diz respeito à quimioterapia da DCh. Desde então diversos estudos foram realizados em busca de novos tratamentos mais eficientes e menos tóxicos, entretanto, a quimioterapia atual ainda se restringe aos mesmos (DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000).

Os medicamentos benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), nomes comerciais: Rochagan® e Radanil®, (LAFEPE) e nifurtimox, (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido, nome comercial: Lampit®, Bayer) são compostos nitro-heterocíclicos e os únicos medicamentos utilizados atualmente no tratamento da DCh em humanos, possuem ação eficaz na fase aguda, fase crônica recente, infecção congênita e acidentes laboratoriais, entretanto, não apresentam bons resultados na fase crônica tardia. A partir da década de 1980 houve a descontinuação da comercialização de Nif no Brasil, seguido de Argentina, Chile e Uruguai devido a sua alta toxicidade e a resistência apresentada pelas cepas (COURA; CASTRO, 2002; DIAS, 2016).

Os dois medicamentos são tóxicos, e apresentam diversos efeitos adversos sérios com danos, principalmente, no sistema nervoso central, trato gastrointestinal, além de sonolência ou excitabilidade, alterações psíquicas, problemas de pele e

náuseas, o que faz com que muitas vezes o tratamento seja suspenso ou abandonado pelos pacientes (COURA; CASTRO, 2002; DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000).

Cerca de 60% dos pacientes que apresentam efeitos colaterais acabam abandonando o tratamento no primeiro mês de uso do medicamento. No estudo de Hasslocher-Moreno *et al.* (2012) os distúrbios mais frequentes foram na pele, sistema gastrointestinal e sistema nervoso respectivamente. A interrupção da quimioterapia aumenta as chances de desenvolvimento de resistência do *T. cruzi* ao fármaco, além de contribuir para o fracasso terapêutico (MAZZETTI, 2014).

O mecanismo de ação do Nif consiste na redução parcial ao ânion radical, em seguida ocorre a auto-oxidação para que seja regenerado o nitrofurano original e formar o radical ânion superóxido, além de outras espécies reativas de oxigênio, como por exemplo o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Vale ressaltar, que o Nif age contra as formas amastigotas do *T. cruzi* de forma tripanossomicida (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007).

Já o mecanismo de ação do Bz ainda não está completamente elucidado, o que se sabe a respeito é que age através de estresse redutivo, envolve reações covalentes de macromoléculas pela nitrorredução de radicais intermediários e vários componentes celulares como lipídios, proteínas e RNA de *T. cruzi* (DOCAMPO, 1990). Tanto o Bz quanto o Nif também atuam sobre o genoma do *T. cruzi*, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas, também aceleram a degradação dessas macromoléculas e causam quebras nas cadeias de nucleotídeos do DNA do parasito (STOPPANI, 1999).

A existência de cepas de *T. cruzi* resistentes ao Nif e Bz e falta de medicamentos mais efetivos na fase crônica tardia, impõem a necessidade de serem encontrados novos fármacos para substituí-los com eficácia, com baixa (ou sem) toxicidade, com baixo custo de produção, que sejam administrados por via oral com poucas doses, que curem pacientes em todas as fases da DCh, e que as chances do parasito desenvolver resistência sejam menores (COURA; CASTRO, 2002; STOPPANI, 1999).

## 2.4 QUIMIOTERAPIAS ALTERNATIVAS

Devido à falta de interesse das indústrias farmacêuticas em investir na descoberta e desenvolvimento de fármacos para a maioria das doenças causadas por protozoários, cabe às instituições de pesquisa e setores públicos, principalmente de países onde há endemismo das doenças, custear os experimentos e investigações necessárias (DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000). Diante do exposto e dos medicamentos Bz e Nif não possuírem total eficácia contra o *T. cruzi*, diversos pesquisadores vêm se dedicando a investigar a eficiência de outros fármacos a fim de encontrar um novo medicamento para o tratamento da DCh que seja mais efetivo e com menos efeitos colaterais.

O itraconazol é um antifúngico triazólico oral, é bastante tolerado e considerado altamente eficaz principalmente pelo seu metabólito hidróxi-itraconazol (DE BEULE; GESTEL, 2001). Possui um amplo espectro de atividade contra uma série de patógenos fúngicos incluindo espécies do gênero *Aspergillus* sp., fungos dimórficos e demáceos, dermatófitos, leveduras e bolores (HARIA; BRYSON; GOA, 1996; POIRIER; CHEYMOL, 1998).

Já o fármaco alopurinol (4-hidroxipirazolol[3,4]pirimidina) é uma pirazolopirimidina comumente usada no tratamento de gota, a partir da década de 1990, passou-se a investigar sua atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* em camundongos. Os resultados similares aos dos fármacos Bz e Nif foram bastante animadores, porém com menos efeitos tóxicos, passou-se então a ser testado em humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Tanto o itraconazol quanto o alopurinol foram estudados por Apt *et al.* (1998), os experimentos evidenciaram cura parasitológica em 53% dos pacientes tratados com itraconazol (6 mg/ kg/ dia por 120 dias) e 44% dos tratados com alopurinol (8,5 mg/ kg/ dia por 60 dias). Houve normalização eletrocardiográfica em 48,2% e 36,5%, respectivamente, dos pacientes com cardiopatia crônica ou recente, ambos os medicamentos apresentaram altas taxas de adesão e efeitos colaterais reduzidos. Além disso, estudo feito por Martins *et al.* (2015), demonstrou que a combinação de itraconazol e Bz na dose de 75 mg/ kg apresentou resultados quatro vezes mais eficazes do que cada um dos fármacos usados isoladamente.

O TAK-187 é um triazol antifúngico que apresenta meia-vida terminal longa em vários animais contra o *T. cruzi*. Quando administrada por via oral na dosagem diária de 20 mg/ kg induz proteção completa contra morte em camundongos e altos níveis de cura parasitológica independente da cepa, que variam entre 60 e 100% de cura. É um fármaco potente anti-*T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*, mesmo perante a cepas resistentes a compostos nitroimidazólicos e nitrofuranos (URBINA *et al.*, 2003b).

O ravuconazol é também um fármaco triazólico, mas com meia-vida terminal curta, é um potente antifúngico e possui uma potente atividade anti-*T. cruzi* quando testado *in vitro*, entretanto, estudos anteriores evidenciam que este medicamento só apresenta boa atividade *in vivo* em modelos murinos quando administrado duas vezes ao dia e durante a fase aguda da doença, não apresenta boa eficácia contra cepas resistentes a medicamentos (URBINA *et al.*, 2003a).

O posaconazol é um triazol antifúngico administrado via oral, geralmente bem tolerado e que apresenta amplo espectro de atividade. Apresenta atividade clinicamente relevante contra diversas infecções fúngicas invasivas que são refratárias ou intolerantes a outras terapias (como aspergilose, zigomicose e fusariose), também apresenta eficácia em pacientes com neutropenia febril e candidíase orofaríngea e esofágica (KEATING, 2005).

O posaconazol é um análogo do itraconazol, e é considerado atualmente o mais forte candidato como novo tratamento específico para DCh (OLIVEIRA *et al.*, 2008), sendo o fármaco com o desenvolvimento mais avançado tanto em modelo experimental quanto em ensaios clínicos. Apresenta uma atividade significativa contra *T. cruzi* nos experimentos *in vitro* e *in vivo* (que varia de acordo com a cepa e a dosagem), já o resultado em humanos não atendeu as expectativas, uma vez que demonstrou atividade contra o protozoário *T. cruzi*, mas não o suficiente para que houvesse cura, portanto, há chances de sua atividade ser maior quando administrada em combinação com outras drogas ou em terapias sequenciais (MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2015).

#### **2.4.1 Metronidazol**

O metronidazol (1-( $\beta$ -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) é um antibiótico e antiparasitário sintético derivado do nitroimidazol azomicina (produzida pelas bactérias dos filos Actinobacteria e Proteobacteria), que foi sintetizado e descrito pela

primeira vez no ano de 1959. Foi usado inicialmente no tratamento de tricomoníase, infecção causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*. Além disso, é referência no tratamento contra os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Novas propriedades terapêuticas do metronidazol foram descobertas posteriormente, é usado atualmente no tratamento de infecções causadas por Bacteroides, Fusobacteria e Clostridia, rosácea, e em infecções orais, dentais, ginecológicas, do trato respiratório, de ossos e articulações, endocardite e septicemia. Além disso, também pode ser usado como profilaxia antes ou depois de cirurgias e no tratamento de doença de Crohn (CERUELOS *et al.*, 2019).

Os 5-nitroimidazóis utilizados na terapêutica humana são substâncias que possuem ações antiparasitárias e antimicrobianas, tendo sido o metronidazol o primeiro fármaco deste grupo a ser introduzido no tratamento de humanos, e mesmo após tantas décadas ainda é considerado um dos principais representantes do grupo (TAVARES, 2014).

Metronidazol é um medicamento de baixo custo, possui uma boa penetração nos tecidos e apresenta efeitos colaterais relativamente leves (SAMUELSON, 1999). As reações adversas mais comuns são: dores abdominais, náuseas, diarreia, neutropenia reversível, urticária, urina escura e ardor vaginal e uretral. As principais reações no sistema nervoso central são: vertigem, neuropatia periférica, dor de cabeça e ataxia. Em casos raros, neuropatia periférica, neuropatia óptica e encefalopatia foram relatados. Atualmente, o uso terapêutico de metronidazol tem sido associado a neurotoxicidade e genotoxicidade, entretanto, seus efeitos colaterais ainda precisam ser bem estabelecidos (SYDNEY; FINEGOLD, 1980; CERUELOS *et al.*, 2019).

O mecanismo de ação do metronidazol resulta da ligação de produtos intermediários (que são originários de sua redução intracelular) com o DNA, formando assim, complexos que inativam o DNA e inibem sua replicação, o que impede as sínteses enzimáticas e causa morte celular. Este fármaco possui ação seletiva sobre microrganismos e parasitas anaeróbios, devido a presença de um sistema de proteínas de baixo potencial de oxirredução nestes agentes infecciosos (semelhante à ferredoxina), que reduz o metronidazol a produtos intermediários que possuem ação tóxica e são os responsáveis pela atividade antimicrobiana. Os germes aeróbios possuem insensibilidade ao metronidazol, já que não são capazes de reduzir o

fármaco. O uso isolado do fármaco metronidazol se mostrou ineficaz no tratamento da DCh em humanos (TAVARES, 2014). Entretanto, faltam experimentos que demonstrem sua eficácia após hibridização molecular e em terapias combinadas.

## 2.5 HÍBRIDOS E TERAPIA COMBINADA

Uma das estratégias de planejamento de fármacos é chamada de hibridização molecular, que consiste em unir grupamentos farmacofóricos de diferentes substâncias bioativas em um único composto, que passa a ser um composto híbrido, nele pode-se manter características específicas dos compostos isolados. Esta estratégia pode resultar em compostos com afinidade e eficácia melhorada (quando comparado aos medicamentos originais), modos de ação diferentes e/ ou duplos, seletividade modificada e efeitos colaterais reduzidos (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

Outra proposta de uma nova estratégia para o tratamento da DCh é a terapia combinada de fármacos, que pode além de potencializar a ação dos diferentes compostos terapêuticos, ajudar a evitar o desenvolvimento de resistência quimioterápica do parasita. Uma das provas da eficácia desta estratégia, é que diversas doenças só foram controladas após a combinação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação como AIDS, tuberculose e hanseníase. Sendo assim, até que um tratamento específico seja descoberto para a DCh, novas estratégias são necessárias, como a combinação de medicamentos a fim de alcançar maior eficácia com drogas já existentes (COURA, 2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por parasitos atingem todo o mundo e principalmente regiões mais pobres, o que se torna de grande importância médica, sanitária, social e econômica. Apesar de ser endêmica da América Latina, a DCh atinge cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo, e é considerada a doença tropical mais negligenciada, uma vez que mesmo após mais de um século de sua descoberta, a doença continua sem um tratamento efetivo em todas as suas fases, contra cepas resistentes e que apresente baixa toxicidade (COURA; CASTRO, 2002; TARLETON; CURRAN, 2012; WHO, 2020).

Desta forma, se torna de extrema importância a busca por novas estratégias de tratamento, dentre elas estão a hibridização molecular, que pode resultar em melhor afinidade e eficácia dos compostos quando comparado aos medicamentos não hibridizados, seletividade modificada e modos de ação diferentes e/ou duplos. Além disso, a terapia combinada pode reduzir o tempo de tratamento e a dosagem, podendo levar a um menor custo. Ambas estratégias podem reduzir os efeitos colaterais do tratamento, diferentemente dos fármacos utilizados atualmente, que muitas vezes possuem efeitos que levam os pacientes a descontinuarem o esquema terapêutico recomendado (DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000; MARTINS *et al.*, 2015; VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

Deste modo, esta pesquisa se justifica devido ao alto grau de importância de se encontrar novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas, e por isso propõe-se avaliar a utilização de derivados de eugenol que possui ação antiparasitária e do metronidazol que é um fármaco de referência para outras doenças parasitárias causados por protozoários. Além disso, a administração em combinação com Bz, poderá aumentar a atividade anti-*T. cruzi*, levando a um atraso na progressão da doença, redução dos níveis de toxicidade e elevar os índices de cura.

## 4 OBJETIVOS

Todos os objetivos deste trabalho estão descritos abaixo, sendo divididos em objetivo geral e específicos.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*T.cruzi* de novos compostos híbridos de metronidazol acoplados com derivados de eugenol através de testes *in vitro* e *in vivo*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho se propõe a:

- a) verificar a atividade tripanocida *in vitro* dos híbridos de Metronidazol, contra as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y do *T.cruzi*;
- b) verificar a toxicidade dos híbridos em experimento *in vitro* utilizando células H9c2 (ATCC® CRL-1446™);
- c) verificar em triagem *in vivo*, com número reduzido de animais, a influência dos híbridos na parasitemia dos animais, para verificação da toxicidade e a definição da dose a ser utilizada;
- d) avaliar ação tripanocida do melhor composto selecionado na triagem *in vivo* contra formas amastigotas;
- e) verificar o índice de cura através do exame de sangue a fresco, hemocultura e PCR após o tratamento utilizando o composto mais ativo em monoterapia ou combinado com Bz;
- f) verificar a toxicidade das terapias a partir da pesagem dos animais durante o período de tratamento, além de alterações comportamentais e pelos eriçados.
- g) analisar os benefícios na prevenção de lesões cardíacas a partir da análise histopatológica utilizando lâminas coradas por hematoxilina e eosina;
- h) avaliar o efeito na resposta imune humoral e celular através da dosagem de anticorpos e citocinas no plasma por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Abaixo estão relacionados todos os materiais e métodos que foram necessários para a realização desta pesquisa.

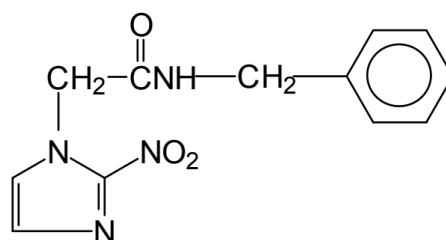
### 5.1 PARASITO

Foi utilizada a cepa Y (DTU II) de *T. cruzi* tanto nos experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. A cepa foi isolada em 1950 a partir de paciente em fase aguda da doença, e foi caracterizada por Filardi e Brener (1987) como sendo parcialmente sensível ao Bz e ao Nif (fármacos de referência). A cepa é mantida em laboratório no Departamento de Patologia e Parasitologia (DPP) da UNIFAL-MG através de congelamento de parasitos e passagens sanguíneas sucessivas entre camundongos *Swiss*.

### 5.2 FÁRMACO E COMPOSTOS

Benznidazol (Bz), nomenclatura IUPAC: N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, fórmula molecular:  $C_{12}H_{12}N_4O_3$  (Figura 1), foi o fármaco usado como referência para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, por ser o único medicamento disponível para tratamento em humanos no Brasil. É produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

Figura 1 - Estrutura química do fármaco benznidazol



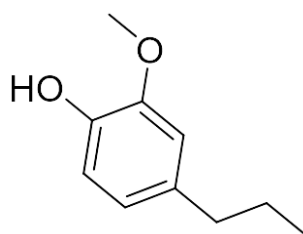
Fonte: DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000.

Os demais compostos abaixo foram produzidos e obtidos pelo Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (UNIFAL-MG). Para a síntese dos compostos utilizados neste trabalho, duas séries de compostos híbridos foram sintetizados, uma delas utilizando a técnica de acoplamento química de “click”, que foi introduzida por Kolb, Finn e Sharpless (2001), que consiste em unir duas moléculas através da formação de um anel triazólico de forma simples e com grande rendimento. A técnica utilizada para a outra série de compostos foi a de acoplamento direto entre as

moléculas, que consiste em unir as moléculas sem haver a presença de conectores entre as subunidades. As técnicas foram utilizadas a fim de avaliar se há diferença entre o acoplamento direto e a utilização do conector triazol.

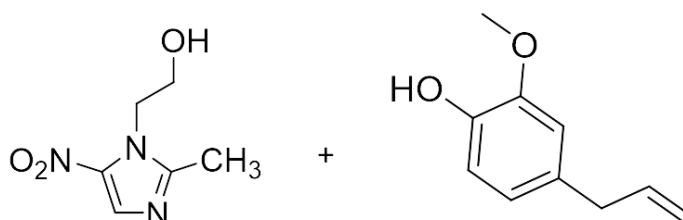
Além das séries citadas, também foram testados compostos que não passaram por hibridização molecular, sendo eles o diidroeugenol (CEI02) (Figura 2) e a mistura física de metronidazol em eugenol (MG02) (Figura 3). O composto CEF05 é inédito na literatura e consiste na hibridização molecular do fármaco metronidazol acoplado ao diidroeugenol nitrado na posição 5 (Figura 4).

Figura 2 - Estrutura química do composto CEI02



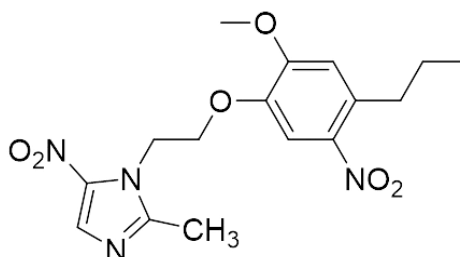
Fonte: PELOZO *et al.*, 2021.

Figura 3 - Estrutura química do composto MG02



Fonte: PELOZO *et al.*, 2021.

Figura 4 - Estrutura química do composto CEF05.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Todos os fármacos aqui listados foram testados quanto a suas ações tripanocidas em cepa Y de *T. cruzi* em testes *in vitro* contra as formas epimastigotas e tripomastigotas e *in vivo* em modelos murinos. Avaliação da toxicidade do fármaco e compostos também foi realizada, para saber os reais benefícios de cada um dos

tratamentos.

### 5.3 EXPERIMENTOS *in vitro*

Neste tópico, estão relacionados os materiais e métodos necessários para a realização dos experimentos *in vitro*. Inicialmente, uma série de compostos híbridos de metronidazol com derivados de eugenol e os dois compostos não hibridizados foram testados, para que no final dos ensaios *in vitro*, fossem selecionados os compostos com maiores atividades anti-*T. cruzi* e baixas taxas de toxicidade, para que prosseguisse os testes *in vivo* com os mesmos.

#### 5.3.1 Atividade contra formas epimastigotas

Para a obtenção de epimastigotas da cepa Y usados neste trabalho, os parasitos foram adicionados em tubos falcon juntamente de 3mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino) e incubados em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28°C. Foi adicionado a cada dois dias 3mL de meio LIT em cada um dos tubos com a cultura de parasitos, que foram submetidas a repiques semanais, o que resultou em crescimento exponencial do parasito para uso em experimento.

Com o intuito de testar a potencial ação dos compostos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi in vitro*, comparativamente ao fármaco de referência Bz, dois experimentos independentes foram realizados conforme descrito a seguir. Cada uma das substâncias testadas foi disposta em sete concentrações decrescentes (diluição 1:2) em duplicata, com concentração inicial de 200µg/mL e final de 3,12µg/mL. Em microplacas de 96 poços, foi adicionado 200µL/poço de cada substância em sua respectiva diluição, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para que a concentração de parasitos fosse ajustada a  $1,5 \times 10^6$ /mL, os parasitos foram então adicionados aos poços já contendo previamente a diluição seriada dos compostos e de Bz. As placas continham também controles negativos (poços que continham apenas meio LIT), controles positivos (meio LIT + parasito) e controles contendo meio LIT e os compostos (sem parasitos), a fim de avaliar o quando cada composto seria capaz de reduzir a resazurina.

As placas passaram por incubação de 72 horas a 28°C em estufa BOD, para

que em seguida fosse adicionado 20  $\mu\text{L}$ /poço de resazurina, as placas foram incubadas por mais 12 horas a 28°C. Posteriormente, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm e 600 nm, através dos valores obtidos foi então calculada a porcentagem de inibição de proliferação a partir da fórmula descrita abaixo:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle}}} \right] \times 100$$

Onde,  $A_{570}$  = absorvância em 570nm;  $A_{600}$  = absorvância em 600nm e  $R_0$  = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (meio LIT sem parasitos, com adição de resazurina) sendo,  $R_0 = (A_{570}/A_{600})$ . A partir dos resultados do percentual de inibição, o software CompuSyn foi utilizado para realização do cálculo IC50 (concentração inibitória do composto/fármaco capaz de matar 50% dos parasitos).

### 5.3.2 Atividade contra formas tripomastigotas

Para que fossem obtidos parasitos da cepa Y na forma tripomastigota, foi coletado de camundongos previamente infectados, 200 $\mu\text{L}$  de sangue do plexo venoso retro-orbital no dia de pico máximo de parasitemia (7º dia após infecção). Os parasitos então foram contados em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada a 1,5x10<sup>6</sup> parasitos/mL.

Em microplacas de 96 poços, foram adicionadas diluições seriadas em concentrações decrescentes de cada um dos compostos (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em duplicata, juntamente do meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), totalizando 200 $\mu\text{L}$ /poço, os tripomastigotas também foram adicionados na proporção ajustada 1,5x10<sup>6</sup>/mL. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Passado este período, o número de parasitos foi quantificado através de contagem em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer, o número resultante foi adicionado ao software *CompuSyn* para realização do cálculo IC<sub>50</sub>.

### 5.3.3 Atividade contra formas amastigotas

As células utilizadas para este ensaio foram as células de cardiomioblastos de

ratos neonatos H9c2 (American Type Culture Collection, ATCC: CRL 1446), que foram incubadas e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C para crescimento. Já para obtenção dos tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, foi coletado de camundongos previamente infectados, 200µL de sangue do plexo venoso retro-orbital no dia de pico máximo de parasitemia (7º dia após infecção).

As células foram infectadas pelo parasito na proporção de 10 parasitos para cada célula H9c2 e incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C. Passado este período foi removido o meio de cultura e lavou-se a placa com PBS a fim de eliminar todos os parasitos que não haviam internalizado as células e foi adicionado novo meio de cultura e incubadas por mais 72 horas a 37°C. Passado este período coletou-se o sobrenadante e centrifugou-se por 2 minutos a 3500 rpm para que não restassem debris celulares. O sobrenadante foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 3500 rpm, o sedimento foi adicionado em meio de cultura para utilização no experimento com amastigotas.

Com o intuito de testar a potencial ação dos do híbrido CEF05 contra as formas amastigotas de *T. cruzi in vitro*, comparativamente ao fármaco de referência Bz, realizou-se o experimento conforme descrito a seguir. Utilizou-se para este experimento placa de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm, foram plaqueadas 1x10<sup>4</sup> células/poço de células H9c2 e foi incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C durante 24 horas. Passadas as horas de incubação, as células foram infectadas na proporção de 20:1 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* por célula H9c2, a placa foi novamente incubada por 24 horas nas mesmas condições citadas anteriormente, para que pudesse ocorrer a internalização dos parasitos.

Após, para eliminação dos parasitos não internalizados, descartou-se o sobrenadante e lavou-se os poços com o meio DMEM a 10% por três vezes. Diluiu-se o híbrido CEF05 e o Bz em meio DMEM a 10% nas seguintes concentrações (10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL), que foram testadas em duplicata, em seguida adicionou-se o volume de 1 mL por poço, também foi adicionado a placa controle de células infectadas e não tratadas. A placa foi incubada por 72 horas a 37°C, após realizou-se lavagem com DMEM 10%, fixou-se as lamínulas com metanol durante 5 minutos, após a fixação as lamínulas foram coradas com corante Giemsa diluído a 10% em água destilada.

Para a montagem das lâminas com as lamínulas já coradas, utilizou-se o auxílio

de Entellan para a colagem das mesmas, posteriormente as lamínulas foram levadas ao microscópio óptico com objetiva de 100x e óleo de imersão para que fosse determinada a quantidade de células infectadas, para isso 100 células foram contadas por lamínula e contados também o número de amastigotas em cada célula infectada. As células que apresentaram mais de 50 amastigotas em seu citoplasma foram representadas como “>50” na tabela de resultados e as mesmas não foram adicionadas a média de amastigotas por célula devido ao seu número inespecífico.

### 5.3.4 Citotoxicidade

A fim de avaliar a toxicidade dos compostos e do fármaco Bz (para fins de comparação) frente a células H9c2 (oriundas de cardiomioblastos de ratos), utilizou-se o protocolo descrito por Diniz *et al.* (2013) com modificações. Desta forma, foi adicionado 100 µL/poço de suspensão celular na concentração de  $1 \times 10^3$  células/mL (em duplicata para cada um dos compostos e fármaco), em placas de 96 poços, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Aguardado este tempo, o meio foi removido e substituído por 200 µL/poço de um novo meio contendo sete diferentes concentrações decrescentes (200µg/mL a 3,12µg/mL) de cada um dos compostos e também do fármaco Bz (diluição 1:2). Em cada uma das placas foram adicionados controles negativos (apenas meio DMEM) e controles positivos (contendo meio DMEM e células H9c2), as placas foram incubadas por mais 72 horas.

Após, adicionou-se 20 µL/poço de resazurina, as placas foram novamente incubadas por mais 12 horas até que a resazurina fosse reduzida, passado este período as placas foram lidas em espectrofotômetro nas absorvâncias de 570nm e 600nm. A partir dos números obtidos através da leitura, foi calculada a porcentagem de inibição da proliferação induzida por cada um dos compostos testados e do Bz, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle+}}} \right] \times 100$$

Onde, A<sub>570</sub>= absorvância em 570nm; A<sub>600</sub> = absorvância em 600nm e R<sub>0</sub>= fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (meio DMEM sem células, com adição de resazurina) [R<sub>0</sub>=(A<sub>570</sub>/A<sub>600</sub>)C-]. Os resultados do

percentual de inibição foram adicionados ao software CompuSyn para cálculo do  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células). Foram realizados dois experimentos independentes, para análise da citotoxicidade dos compostos e do fármaco. A partir dos resultados adquiridos de  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  para cada uma das formas do parasito, foi calculado o índice de seletividade (IS), utilizando a seguinte fórmula  $IS = CC_{50}/IC_{50}$ , resultados de IS acima de 30 indicam um tratamento seguro.

#### 5.4 EXPERIMENTOS *in vivo*

Neste tópico, estão relacionados os materiais e métodos necessários para a realização dos experimentos *in vivo* utilizando modelos murinos. Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNIFAL-MG (CEUA nº59/2017).

##### 5.4.1 Triagem *in vivo*

A triagem *in vivo* feita nesta pesquisa, teve como objetivo escolher a partir de um número reduzido de animais, quais dos compostos testados apresentaria maior atividade *in vivo*, e quais seriam as dosagens otimizadas do mesmo, a fim reduzir o número de animais utilizados em experimento mais aprofundado e de maior duração (experimento final).

###### 5.4.1.1 Animais

Foram utilizados para a triagem *in vivo* 31 camundongos da linhagem *Swiss*, de ambos os sexos com idade de 30 dias e pesando entre 21 e 27g, estes camundongos foram cedidos pelo Biotério Central da UNIFAL-MG.

Durante todo tempo de experimentação os animais foram mantidos em biotério com temperatura e fotoperíodo controlados, com água e ração comercial *ad libitum*.

###### 5.4.1.2 Infecção, tratamento, parasitemia e parâmetros biológicos

Os animais foram infectados de forma intraperitoneal com 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y, coletados no dia de pico de parasitemia (7º dia após infecção) a partir do plexo venoso retro-orbital de camundongo *Swiss* previamente infectado e

mantidos no biotério.

A divisão dos grupos experimentais foi feita da seguinte forma (Tabela 1), para cada composto testado 9 camundongos foram utilizados, que foram subdivididos em 3 animais para cada dosagem administrada (10, 50 e 100 mg/Kg). Também foram utilizados 4 animais para o grupo controle positivo (infectados e não tratados), os compostos foram solubilizados com 5% de cremophor.

Tabela 1 - Grupos experimentais da triagem *in vivo* com seus respectivos tratamentos e dosagens.

Grupos	Infecção	Dosagem	Nº animais/dose	Nº animais/grupo
C+	+	Não tratados	4	4
CEIO2	+	10mg/kg	3	9
		50mg/kg	3	
		100mg/kg	3	
CEFO5	+	10mg/kg	3	9
		50mg/kg	3	
		100mg/kg	3	
MG02	+	10mg/kg	3	9
		50mg/kg	3	
		100mg/kg	3	
			<b>Total</b>	<b>31 camundongos</b>

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (C+): Grupo controle positivo;(+): Grupos de camundongos infectados com *T. cruzi*.

A confirmação da infecção se deu através da coleta e análise diária do sangue da ponta da cauda dos animais (exame de sangue a fresco), o tratamento então teve início no primeiro dia em que os camundongos apresentaram parasitemia patente (5º dia após infecção) e prosseguiu por 6 dias, onde receberam a administração de todos os compostos de forma oral através de gavagem.

A parasitemia foi realizada através da coleta diária de 5µL de sangue da cauda dos animais para realização do exame de sangue a fresco, em microscópio óptico foi contado o número de parasitos em 50 campos com objetiva de 40x e multiplicado por 5000 (fator do microscópio) para obtenção do número de parasitos a cada 0,1 mL de sangue (BRENER, 1962). A curva parasitemia foi feita do 5º (dia da confirmação da infecção patente na maioria dos camundongos) até o 13º dia após a infecção para acompanhamento da redução ou aumento da parasitemia.

Os parâmetros biológicos utilizados foram alteração de peso, avaliado a partir de pesagem periódica e mortalidade, que foi avaliado até o 35º dia após a infecção,



os animais que sobreviveram até o último dia do experimento foram eutanasiados.

#### 5.4.2 Experimento final

A partir dos testes feitos na triagem *in vivo*, foi possível selecionar qual dos três compostos testados anteriormente teve o melhor resultado quanto a redução da parasitemia e dos efeitos tóxicos. O composto selecionado foi o híbrido CEF05 que passou a ser testado em maior número de camundongos, e em combinação com o fármaco de referência Bz, testes mais aprofundados para análise de sua eficácia contra o parasito *T. cruzi* foram utilizados.

##### 5.4.2.1 Animais

Para o experimento final foram utilizados 80 camundongos da linhagem Balb/C, fêmeas, com cerca de 30 dias de idade e pesando entre 15 e 20g. Os camundongos utilizados no experimento final foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais do experimento final foram mantidos nas mesmas condições daqueles que participaram da triagem *in vivo*, como descrito anteriormente.

##### 5.4.2.2 Infecção e tratamento

Os animais foram infectados de forma intraperitoneal com 5000 tripomastigotas, provenientes de passagens sucessivas entre camundongos *Swiss* mantidos no biotério. Os mesmos foram divididos em 8 grupos de 10 camundongos cada como relacionados abaixo (Tabela 2). Os compostos foram solubilizados em 5% de cremophor, já o Bz foi ressuspendido em carboximetilcelulose. A administração dos compostos e do medicamento em monoterapia ou combinados teve início a partir da confirmação da infecção (5º dia) e prosseguiu por 21 dias onde, através de gavagem os animais receberam 0,1 mL de seus respectivos tratamentos.

Tabela 2 - Divisão dos grupos experimentais do experimento *in vivo* final com seus respectivos tratamentos.

Grupos	Infecção	Tratamento	Nº de animais
Grupo 1	-	Não tratados (Controle negativo)	10
Grupo 2	+	Não tratados (Controle positivo)	10
Grupo 3	+	Bz 100 mg/Kg	10
Grupo 4	+	CEF05 100 mg/Kg	10
Grupo 5	+	Bz 50 mg/Kg	10
Grupo 6	+	CEF05 50 mg/Kg	10
Grupo 7	+	Bz 50 mg/Kg + CEF05 50 mg/Kg	10
Grupo 8	+	Bz 50 mg/Kg + CEF05 100 mg/Kg	10
<b>Total</b>			<b>80 camundongos</b>

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (+): Grupos de camundongos infectados com *T. cruzi*; (-): Grupo de camundongos não infectados.

#### 5.4.2.3 Parasitemia e parâmetros biológicos

A curva de parasitemia foi feita a partir da análise diária do exame de sangue a fresco dos camundongos onde para a quantificação do número de parasitos foram coletados 5µL de sangue a partir de um pequeno corte na ponta da cauda dos animais. O sangue então foi adicionado em lâmina de vidro e coberto com lamínula 22x22 mm e lido em microscópio óptico 50 campos em objetiva de 40x, o número resultante foi multiplicado por 5000 para obtenção da quantidade de parasitos a cada 0,1 mL de sangue. A curva de parasitemia teve início a partir da confirmação da infecção, que ocorreu no 5º dia após a infecção na maioria dos camundongos e se estendeu até o 42º dia após a infecção.

Os parâmetros biológicos avaliados no experimento final foram ganho ou perda de peso (pesagens periódicas), alterações na pelagem como pelos eriçados, análise comportamental através do método de livre observação, onde todos os dias os animais eram observados quanto a movimentação de cada grupo experimental e a reação dos animais ao manipular as gaiolas e ao tocá-los, estes parâmetros foram utilizados para auxiliar na análise da toxicidade *in vivo*.

#### 5.4.2.4 Necropsia

Aos 43 dias de infecção e momentos antes da eutanásia e necropsia, foi coletado sangue do seio venoso retro-orbital dos camundongos para que fossem

utilizados para dosagem de citocinas. Em seguida, os animais foram eutanasiados a partir de inalação de isoflurano em câmara específica e posteriormente foi realizada a necropsia na qual foram retirados o coração, fígado, baço e músculo esquelético da pata inferior de cada camundongo. Os órgãos foram lavados com PBS, pesados (exceto músculo esquelético) e seccionados.

A porção direita do coração foi subdividida em duas partes, onde uma delas foi utilizada para análise de PCR e a porção esquerda dos corações foram acondicionados em solução de formol 10% tamponada por no mínimo 24 horas, onde posteriormente foram utilizados para análises histológicas. Os demais órgãos e uma das secções da porção direita do coração foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *5.4.2.4.1 Peso dos órgãos*

Para análise do peso relativo dos órgãos, os camundongos foram pesados no mesmo dia da necropsia assim como os órgãos coletados. Os pesos dos órgãos então foram divididos pelo peso de cada um dos camundongos para obtenção do peso relativo, e posteriormente foi analisado o aumento ou redução da massa dos órgãos comparados aos grupos controle.

#### *5.4.2.4.2 Histologia*

As porções esquerdas do coração foram acondicionadas por no mínimo 24 horas em solução de formol 10% tamponado, posteriormente foram desidratadas em bateria alcoólica de concentração crescente, ficando por uma hora em cada um dos álcoois  $70^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$ ,  $90^{\circ}$ ,  $95^{\circ}$ , absoluto I, absoluto II e por último uma solução de álcool absoluto mais xilol.

Em seguida, os órgãos ficaram imersos por uma hora e meia em xilol para que houvesse a diafanização. Após, os órgãos foram imersos em dois banhos de parafina, onde permaneceu por uma hora em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante o primeiro banho e com a segunda parafina foram confeccionados os blocos. Após o enrijecimento dos blocos, os mesmos foram moldados e cortados em cortes seriados de  $5\mu\text{m}$  em micrótomo.

A técnica utilizada para coloração das lâminas foi de hematoxilina e eosina, para isso os cortes seriados dos fragmentos dos órgãos foram fixados nas lâminas, para que fosse feita a desparafinização através da imersão em dois banhos de xilol durante 5 minutos em cada um deles. Em seguida, foram hidratados através de uma

bateria de álcoois em concentração decrescente, álcool absoluto I, absoluto II, absoluto III, 95°, 90° e 70°, após, foram lavadas em água corrente durante 5 minutos.

Em seguida, as lâminas permaneceram em imersão no corante hematoxilina durante 1 minuto, e foram lavadas em água corrente durante 5 minutos após este tempo. As lâminas então permaneceram por 2 minutos imersas no corante eosina, onde ao final foram passadas rapidamente pela água, por cerca de cinco vezes para retirada do excesso do corante.

Após a coloração, as lâminas passaram por um novo processo de desidratação através de bateria de soluções alcoólicas crescentes (70°, 90°, 95°, absoluto I, absoluto II, absoluto III), onde permaneceram por 2 minutos em cada um deles, seguidamente, passaram por dois banhos de xilol com duração de 2 minutos em cada e logo após ocorreu a montagem das lâminas com auxílio de entellan e cobertas por lamínula 24x60 mm.

Para análise das lâminas, utilizou-se microscópio óptico com objetiva de 40x e microcâmera AxionCam IC3 Zeiss, acoplada ao programa Axion Vision para o registro das imagens. Os núcleos inflamatórios do coração foram então contados manualmente com auxílio do software Image J, para a quantificação da miocardite.

#### 5.4.2.5 Avaliação da eficácia terapêutica

A avaliação da eficácia terapêutica foi baseada em três testes independentes: exame de sangue a fresco, hemocultura e PCR. Os camundongos foram então considerados curados quando apresentaram resultados negativos para os três testes.

##### 5.4.2.5.1 Exame de sangue a fresco

O exame de sangue a fresco foi feito através de coleta e análise diária do sangue da ponta da cauda dos camundongos que teve duração do 5º dia até o 42º dia após infecção, para análise da redução ou aumento da parasitemia, supressão e reativação natural da parasitemia.

##### 5.4.2.5.2 Hemocultura

Antes que fosse realizada a eutanásia, no mesmo dia coletou-se de forma asséptica do seio venoso retro-orbital dos camundongos 200µL de sangue que foram

mantidos em tubos Falcon juntamente de 2ml de meio LIT, os tubos então permaneceram em estufa com 28°C e homogeneizados a cada 48 horas.

A hemocultura então foi analisada por três vezes em microscópio óptico em objetiva de 40x para detecção de epimastigotas a cada trinta dias. Para detecção, adicionou-se em lâmina de vidro 10µL do sobrenadante da hemocultura que foi coberto com lamínula 22x22 mm, sendo assim, os animais que apresentaram epimastigotas em sua hemocultura foram considerados positivos e não curados.

#### 5.4.2.5.3 PCR quantitativa em tempo real

##### (i) Método de padronização das estratégias de quantificação de DNA através do método do ciclo threshold (Ct) comparativo

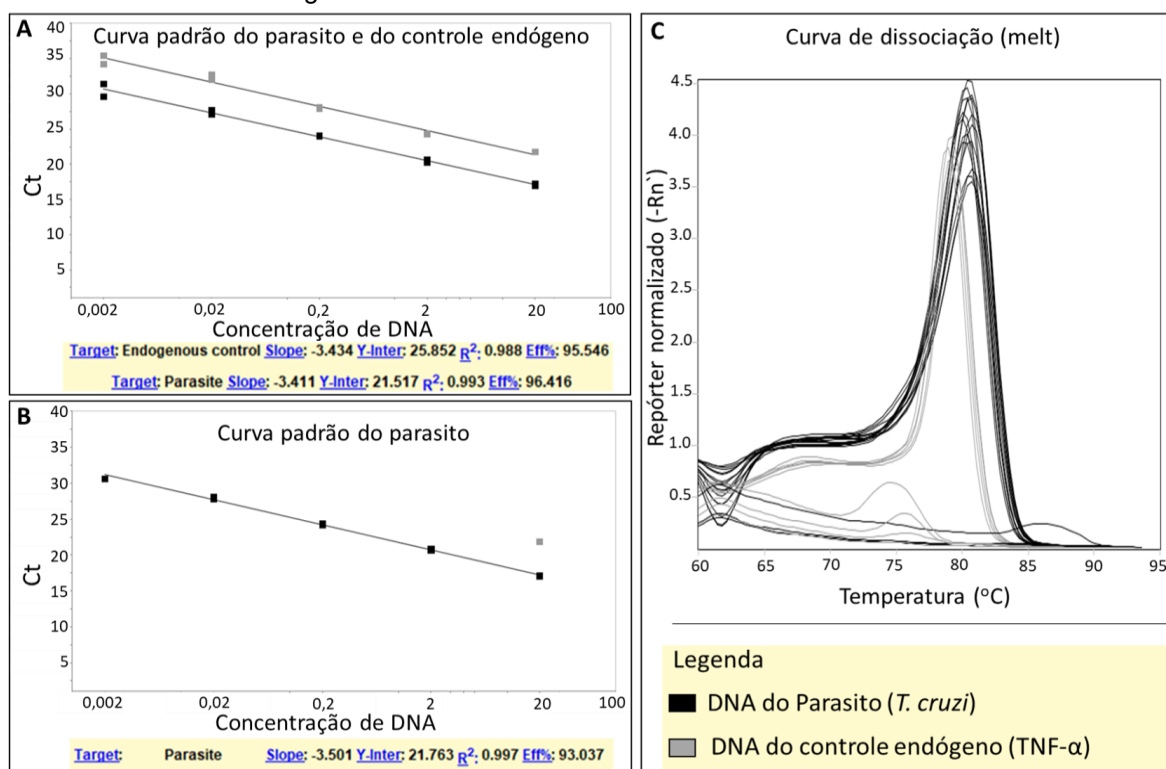
Inicialmente foram geradas curvas padrão de concentrações conhecidas de DNA do parasito proveniente de formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* (Figura 5). Juntamente foi adicionado o DNA genômico do tecido cardíaco de camundongo não infectado. Dessa forma, a determinação do limite de quantificação e a eficiência da amplificação do qPCR foi feita através das curvas padrão, as mesmas foram geradas a partir de  $2 \times 10^1$  parasitos-equivalentes/ µL junto do DNA do tecido cardíaco do camundongo não infectado na concentração de  $2 \times 10^1$  unidades arbitrárias/µL de DNA (25ng/ µL de DNA de tecido cardíaco).

Os parasitos e o DNA do tecido muscular cardíaco foram submetidos a cinco diluições seriadas (1:10) tanto em água, que resultaram nas curvas padrão para o DNA do parasito e para o DNA do controle endógeno que foi utilizado (TNF-α), e também em DNA de tecido muscular cardíaco dos camundongos não infectados (curva padrão para o DNA do parasito em DNA do tecido muscular cardíaco constante).

Como estratégia de quantificação, foi utilizada o método Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) como base para a padronização, seguido da conversão de dados de quantificação relativa para dados de parasito-equivalente/25ng de DNA tecidual cardíaco. Após a validação do método, foi utilizado o calibrador com quantidade conhecida de DNA de parasitos e de tecido cardíaco em todas as placas de qPCR, para que as cargas de *T. cruzi* foram estimadas, não sendo necessário neste caso a utilização da curva padrão em cada uma das placas.

Através do software do termociclador *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*) foi calculado automaticamente a quantificação relativa de DNA do parasito/ DNA de tecido cardíaco das amostras analisadas em relação a amostra calibradora, uma vez que a amostra calibradora já possuía a concentração conhecida de parasito/DNA de tecido cardíaco, permitiu a conversão dos dados relativos para a conversão de dados quantitativos.

Figura 5 - Curvas padrão e de dissociação geradas a partir de DNA de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* com o DNA genômico de tecido cardíaco de animais não infectados.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (A) Curva padrão gerada a partir da diluição seriada 1:10 do DNA proveniente de  $2 \times 10^1$  parasitos/ $\mu\text{L}$  em  $2 \times 10^1$  unidades arbitrárias (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) de DNA de tecido cardíaco de camundongo. (B) Curva padrão gerada a partir da diluição seriada 1:10, em água, de DNA proveniente de  $2 \times 10^1$  parasitos/ $\mu\text{L}$  e  $2 \times 10^1$  unidades arbitrárias (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) de DNA de tecido cardíaco de camundongo. (C) Curvas de dissociação dos segmentos de DNA amplificados após 40 ciclos de PCR em tempo real. Linhas pretas correspondem ao DNA do parasito e linhas cinzas ao DNA do controle endógeno.

### (ii) PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para a realização da PCR quantitativo em tempo real (qPCR), o sangue foi coletado do seio venoso retro-orbital minutos antes da eutanásia de todos os animais que não vieram a óbito naturalmente. As amostras foram dosadas em espectrofotômetro e diluídas até atingirem 25ng/  $\mu\text{L}$ . Para cada uma das amostras que

foram realizadas em duplicata, a reação de PCR teve 2 µL de DNA genômico + 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a repetição de 195pb de DNA de *T. cruzi*, onde foram utilizados os seguintes primers TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', onde M = A ou C), e TCZ-R (5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') amplificando um produto de 182 pb, 5 µL de Sybr®Green PCR Mastermix, e água Milli-Q para 10 µL de volume final de reação, assim como descrito por Cummings e Tarleton (2003).

Separadamente, em cada uma das amostras foi dosado TNF-α (que foi utilizado como controle endógeno normalizador) em duplicata, que continha 2 µL de DNA genômico + 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3' (CUMMINGS, TARLETON, 2003), amplificando um produto de 170 pb, 5 µL de Sybr®Green PCR Mastermix, e água Milli-Q para 10 µL de volume final de reação.

Para a distribuição das reações, foram utilizadas microplacas de 96 poços (*Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™*), que passaram por centrifugação a 2000 rpm durante 2 minutos, em seguida, foram levadas ao termociclador *StepOnePlus (Applied Biosystems)*, onde foram aquecidas a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 64,3°C por 1 minuto, com a aquisição da fluorescência a 64,4°C.

Logo em seguida, passaram por um programa de melting com desnaturação inicial a 95° C por 15 segundos, foram resfriadas por 1 minuto a 60°C e a temperatura foi aumentada de forma gradual de 0,3°C/s até atingirem 95°C. Cada placa tinha uma amostra calibradora (referência) e um controle negativo de PCR, que continha água no lugar do DNA.

#### 5.4.2.6 Alterações comportamentais, na pelagem e de peso nos camundongos

Durante todo o experimento os animais foram avaliados diariamente quando a alterações comportamentais e no aspecto físico da pelagem, quaisquer alterações e seus níveis foram registrados. Os animais passaram também por pesagens periódicas (duas vezes na semana) durante todo o experimento, para que o cálculo de perda ou ganho de peso dos animais subtraiu-se o peso inicial (dia da inoculação dos parasitos/dia 0) dos demais pesos que os camundongos apresentaram durante todo o experimento, sendo assim, após o cálculo foi montado o gráfico contendo as curvas

de alteração de peso dos animais, para acompanhamento e comparação entre os grupos tratados e grupos controle.

#### 5.4.2.7 Avaliação imunológica

Para a avaliação imunológica, utilizou-se o teste imunoenzimático ELISA para dosagem das citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, e foi utilizado o mesmo teste para a quantificação dos anticorpos IgG total e subclasse IgG1, ensaios estes que estão relacionados abaixo.

##### 5.4.2.7.1 IgG Total e IgG1

A fim de dosar os anticorpos da classe IgG total e a subclasse IgG1 através do teste ELISA, coletou-se cerca de 200µL de sangue no seio venoso retro-orbital dos camundongos um dia após o término do tratamento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm e 4°C. Coletou-se o sobrenadante, e centrifugou-se novamente nas mesmas condições da centrifugação anterior a fim de coletar o máximo de soro possível, o soro foi então acondicionado em tubos eppendorf e mantidos a -20°C até que fossem utilizados.

Para os ensaios imunoenzimático ELISA, foi utilizado antígenos de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, que foram obtidos por cultivo acelular dos parasitos em meio LIT, utilizou-se também como conjugado a anti-imunoglobulina IgG total dos camundongos, marcada com peroxidase.

Utilizando placas de 96 poços, inicialmente os poços foram sensibilizados a partir de 100µL de antígeno diluído em solução tampão carbonato, cujo pH foi de 9,6, as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 4°C *overnight*. Após, as placas foram quatro vezes utilizando solução de lavagem (500 µL de Tween 20 + 1,0 L de PBS 1X), a mesma solução foi utilizada em todas as fases de lavagem. Em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de SFB em PBS (1mL SFB + 19mL de PBS), as placas foram incubadas novamente durante 45 minutos a 7°C, após a incubação foram lavadas duas vezes.

Foram adicionados, 100 µL/poço de soro de cada camundongo, diluído em PBS/Tween 5% na proporção 1:80 nas placas que então foram incubadas por 45 minutos a 7°C e lavadas por 4 vezes após a incubação, para que os anticorpos não



ligantes fossem retirados. Foi adicionado 100 µL/poço de conjugado diluído em PBS/Tween 5% na proporção 1:5000, as placas foram incubadas durante 45 minutos a 7°C e após, lavadas por quatro vezes. Foi adicionado 100 µL/poço da solução de substrato (15mL de solução de ácido cítrico + 1,5 mg de OPD e 3 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (volume 30)). As placas foram incubadas a 37°C por 10 minutos, e para interromper a reação foi adicionado 32 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M (5 N).

Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 490 nm, todas as placas tiveram 10 controles negativos (não infectados) e 4 positivos (infectados e não tratados). Após o procedimento de leitura da absorbância em espectrofotômetro, os valores obtidos foram comparados entre os grupos tratados e com os grupos controle negativo e positivo.

#### 5.4.2.7.2 Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória

Para a dosagem de citocinas, utilizou-se como método de detecção o teste sorológico ELISA com seus devidos kits para a detecção de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e INF-γ e da citocina anti-inflamatória IL-4, seguindo instruções metodológicas descritas pelo fabricante (PeproTech® Brasil- FUNPEC/Ribeirão Preto, SP).

As amostras de sangue utilizadas para o teste foram coletadas um dia após o final do tratamento (26º dia após infecção) através do seio venoso retro-orbital dos camundongos, onde logo em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm e uma temperatura de 4°C, o plasma então foi coletado, o sangue passou por nova centrifugação nas mesmas condições da anterior, a fim de coletar o máximo de plasma possível, todo plasma coletado foi armazenado em tubos eppendorf e acondicionados a -80°C até que prosseguissem os testes.

Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL/poço de anticorpo de captura e cobertas com papel alumínio para incubação *overnight* em temperatura ambiente. Após, as placas foram aspiradas e lavadas com solução de lavagem (contendo 1L de PBS 1x + 500 µL de *Tween* 20), por quatro vezes utilizando 300 µL/poço (todas as lavagens deste procedimento foram repetidas por quatro vezes), com intuito de evitar ligações inespecíficas foi adicionada 300 µL de solução de bloqueio (700mL de PBS 1x + 7g de BSA) em cada um dos poços, as placas foram incubadas novamente por uma hora em temperatura ambiente (assim como todas as demais incubações ocorreram em temperatura ambiente).

As placas foram lavadas, e foi adicionado em seguida 100  $\mu$ L/poço de solução padrão em duplicata, foram então incubadas por mais duas horas. Nova lavagem foi repetida e após a adição de 100  $\mu$ L/poço de anticorpos de detecção, foram incubadas por mais 30 minutos. Em seguida, as placas passaram por mais uma lavagem, e foi adicionado Avidina-HRP na dosagem de 100  $\mu$ L em cada poço, em seguida, foram incubadas por mais 30 minutos.

Por fim, após lavagem foi adicionado 100  $\mu$ L/poço de substrato líquido ABTS e foram incubadas na ausência de luz por cerca de 30 minutos ou até que desenvolvesse coloração. A leitura da absorbância foi lida em espectrofotômetro nas faixas de 405nm e 650nm para a correção do comprimento de onda.

## 5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para que fossem realizados os cálculos de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> dos ensaios *in vitro*, utilizou-se o auxílio do software *CompuSyn*. Já para os ensaios *in vivo* (peso dos órgãos em relação ao corpo dos camundongos, dosagem de citocinas e anticorpos IgG total e IgG1 e miocardite) foi utilizado o software *GraphPad Prism 8* para análise estatística, sendo as análises utilizadas Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey com múltiplas comparações.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo estão relacionados todos os resultados obtidos durante a realização desta pesquisa e a discussão.

### 6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS TRATAMENTOS *in vitro* CONTRA AS FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA Y DE *T. cruzi*

Segundo Indrayanto, Putra e Suhud (2021), o fármaco ideal é aquele que apresenta valores altos de  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células) e baixos de  $IC_{50}$  (concentração inibitória capaz de matar 50% dos parasitos). Sendo assim, previamente a este trabalho, 21 compostos foram sintetizados e tiveram seus  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$  determinados. Após as avaliações *in vitro*, apenas três compostos dos 21 sintetizados foram selecionados, por apresentarem parâmetros mais próximos do fármaco ideal, sendo eles CEI02, CEF05 e MG02.

Todos os compostos selecionados apresentaram atividade contra as formas epimastigotas e tripomastigotas ( $IC_{50}$ ), que inclusive foram bastante similares aos resultados obtidos com o fármaco de referência Bz. Em relação a citotoxicidade, índices mais elevados de  $CC_{50}$  foram obtidos com o híbrido CEF05, o que foi confirmado a partir do índice de seletividade (IS) (Tabela 3).

O índice de seletividade (IS) de um composto é calculado dividindo o valor de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) pela atividade biológica contra o parasito ( $IC_{50}$ ), portanto, indica quantas vezes um composto é mais seletivo contra o parasito do que contra as células hospedeiras (SILVA *et al.*, 2010), sendo assim, quanto mais alto o IS/ mais seletivo, menor é sua citotoxicidade e assim mais seguro.

Os compostos CEF05 e MG02 apresentaram resultados muito satisfatórios de índices de seletividade contra as formas tripomastigotas, uma vez que os resultados de  $IS \geq 10$  representam uma atividade antiprotozoária significativa e boa seletividade (LENTA *et al.*, 2007). O composto CEF05 foi o único que apresentou um IS satisfatório contra as formas epimastigotas.

De acordo com Sykes e Avery (2015)  $IS < 10$  indicam que os compostos testados podem apresentar problemas com toxicidade, e embora o composto CEI02 não tenha sido satisfatório como os demais compostos ( $IS 4,27$  para epimastigotas e

7,27 para tripomastigotas), o resultado do IC<sub>50</sub> em epimastigotas foi o melhor entre os demais compostos, sendo assim, é preciso uma dose bastante baixa do composto para matar muitos parasitos, o que justifica seu uso nos demais experimentos. Os três compostos então foram selecionados para dar prosseguimento em experimentos *in vivo*.

Tabela 3 - Valores de IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e IS, obtidos a partir dos experimentos *in vitro*, utilizando os tratamentos contra as formas tripomastigotas e epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.

Compostos	IC <sub>50</sub> µg/mL±DP Epi	IC <sub>50</sub> µg/mL±DP Tripo	CC <sub>50</sub> µg/mL±DP	IS Epi	IS Tripo
CEI02	3,32 ± 0,73	1,95 ± 0,18	14,19 ± 9,4	4,27	7,27
CEF05	9,6 ± 1,65	2,29 ± 0,16	128 ± 7,29	13,35	55,98
MG02	4,84 ± 0,05	0,46 ± 0,02	39,01 ± 11,69	8,05	84,8
Bz	5,67 ± 1,92	1,34 ± 0,01	>200	>35,2	>149

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (IC<sub>50</sub>): concentração inibitória do tratamento capaz de matar 50% dos parasitos; (CC<sub>50</sub>): concentração citotóxica para 50% das células; (Epi): Resultados em epimastigotas; (Tripo): Resultados em tripomastigotas; (DP): Desvio padrão; (IS): Índice de seletividade.

## 6.2 RESULTADOS DA TRIAGEM *in vivo*

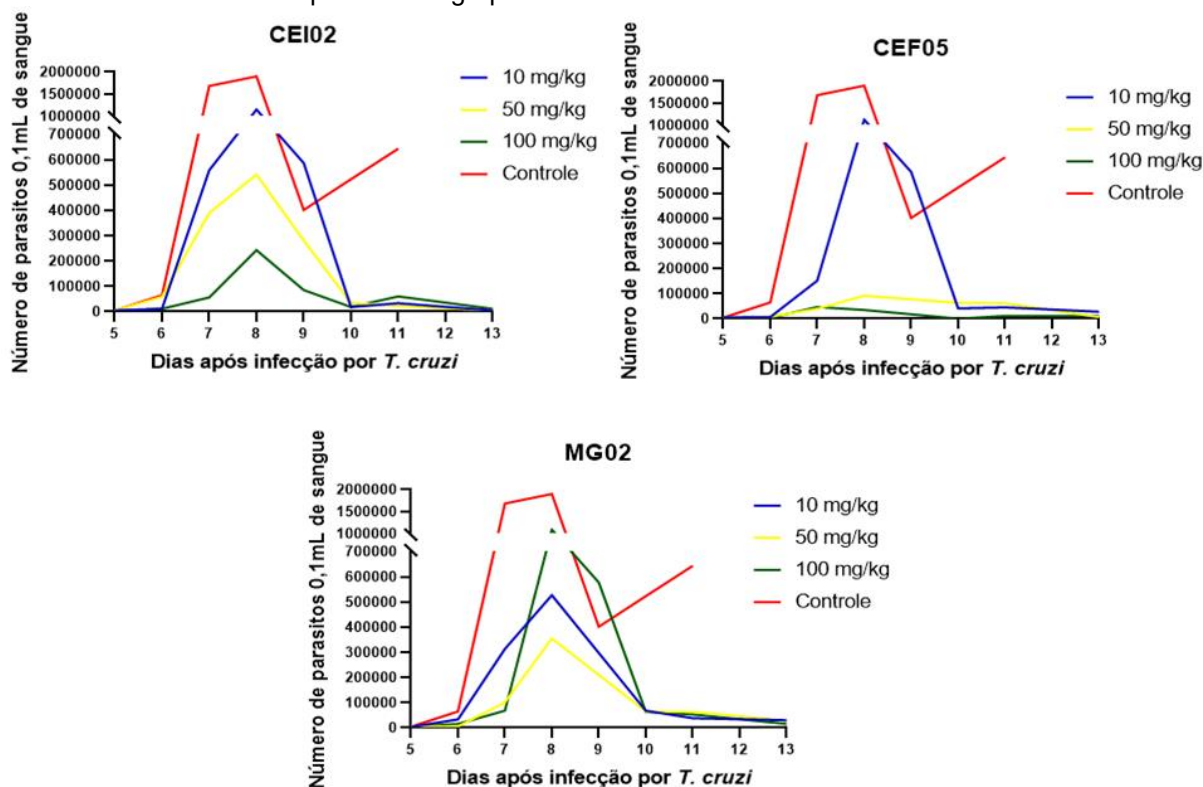
A partir da seleção dos compostos com melhores resultados *in vitro*, os experimentos foram continuados com experimentos *in vivo*. A triagem *in vivo* teve como objetivo verificar se os compostos com atividade comprovada nos experimentos *in vitro* também eram ativos no contexto *in vivo*, e ainda verificar a melhor dose a ser utilizada, para que estudo mais aprofundado fosse continuado com maior número de animais, período mais prolongado de tratamento e usando novas métricas.

### 6.2.1 Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* dos compostos em modelos murinos através da curva de parasitemia

Todos os tratamentos reduziram a parasitemia dos camundongos quando comparados ao grupo controle (infectados e não tratados). Os grupos tratados com a menor dosagem (10 mg/kg) de CEI02 e CEF05 e a com a maior dosagem (100 mg/kg) de MG02, não apresentaram redução significativa no pico de parasitemia quando comparados ao grupo controle. De forma interessante, a maior dosagem do MG02

utilizada foi menos eficiente em reduzir a parasitemia do que as doses inferiores. Este resultado pode ser devido a um possível efeito anti-inflamatório deste composto. (Figura 6).

Figura 6 - Curva de parasitemia dos animais tratados com CEI02, CEF05 e MG02 em três dosagens diferentes e comparados ao grupo controle.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (Controle): Animais infectados e não tratados.

Reduções mais acentuadas foram observadas nos grupos dos compostos hibridizados, o híbrido CEF05 foi o que apresentou maior atividade anti-*T. cruzi* principalmente entre os animais tratados com as maiores dosagens (50 e 100 mg/kg) com picos de 91.666 e 46.666 parasitos/ 0,1mL de sangue, respectivamente, comparados a 1.904.500 parasitos/ 0,1mL de sangue observado entre os animais do grupo controle. Redução significativa também foi observada com o híbrido CEI02 na dosagem de 100mg/kg com pico de 243.333 parasitos/ 0,1mL de sangue, entretanto sua eficácia foi relativamente baixa quando comparada aquela observada com o composto CEF05.

Com seis dias de tratamento administrado uma vez ao dia, não foi possível observar supressão da parasitemia em nenhum dos esquemas terapêuticos utilizados, porém os baixos níveis de parasitemia observados com o híbrido CEF05 o torna

promissor em administrações mais prolongadas e com combinação com a fármaco de referência Bz.

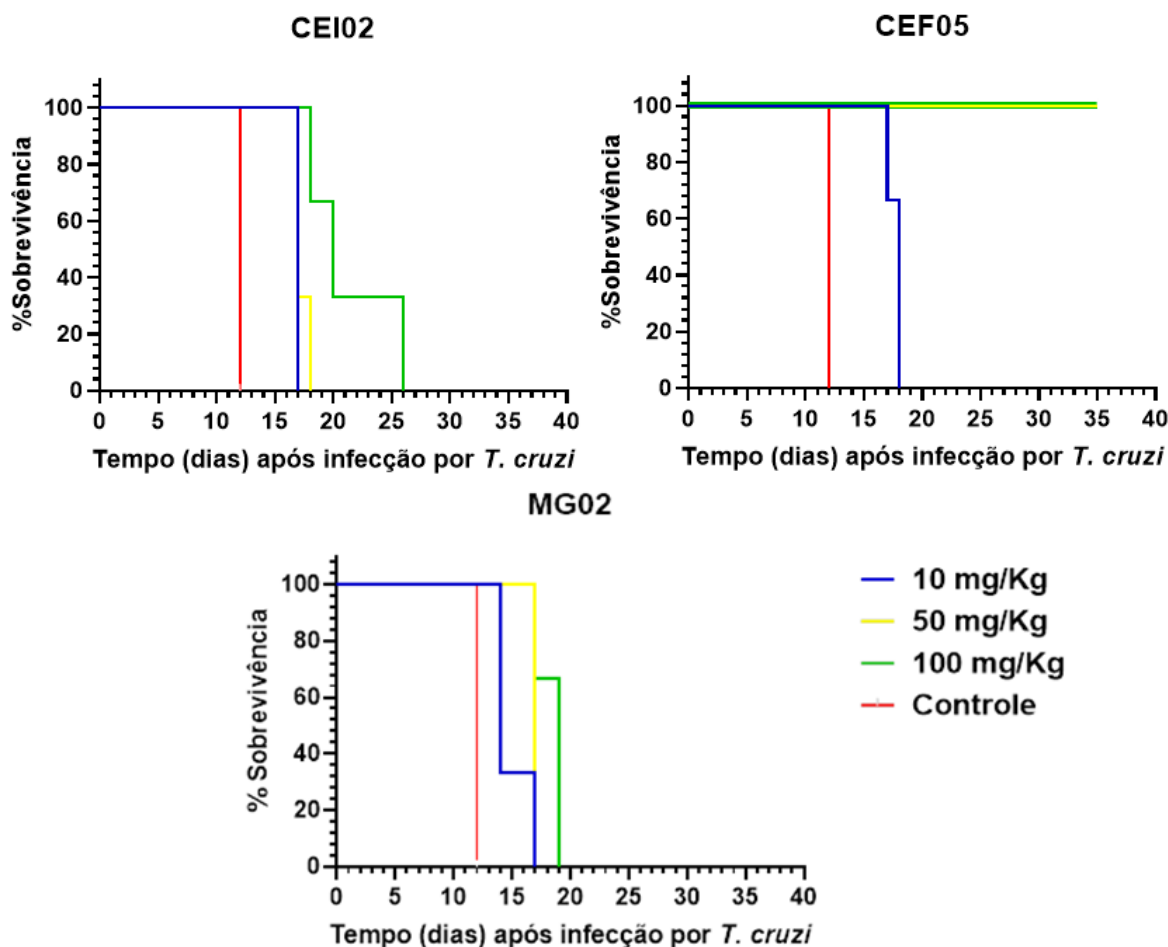
### **6.2.2 Avaliação da tolerabilidade dos compostos pelos camundongos**

Foram utilizados como parâmetros para inferir os níveis de toxicidade dos compostos, a mortalidade e a alteração de peso dos animais. A figura 7 apresenta os gráficos de porcentagem da mortalidade de cada um dos grupos comparados ao grupo controle conforme se passaram os dias após a infecção por *T. cruzi*. Os animais pertencentes ao grupo controle foram os primeiros a virem a óbito aos 11 dias após infecção, seguido pelos animais tratados com 10mg/kg de MG02, no qual 70% dos animais morreram com 13 dias.

O melhor resultado obtido quanto a mortalidade foi o dos animais tratados com CEF05 nas dosagens de 50 e 100 mg/kg, onde todos os animais sobreviveram até o final do tratamento (40º após infecção), seguido CEI02 de 100mg/kg cujo último animal morreu com 26 dias após infecção. As demais dosagens dos compostos apresentaram resultados pouco significativos quando comparados ao grupo controle.

Estudo realizado por Simões-Silva *et al.* (2017), demonstra que a administração de 250mg/kg de metronidazol e 10mg/kg de Bz em combinação, preveniu a mortalidade em 70% dos camundongos. O motivo descrito pelos autores para essa redução da mortalidade, seria uma possível proteção fisiológica da parte elétrica do coração, uma vez que a mesma costuma ser alterada em estudos experimentais. Sendo assim, acredita-se que a proteção da mortalidade observada entre os grupos tratados com 50 e 100mg/kg de CEF05 poderia ter ocorrido desta forma, entretanto a proteção direta incontestável, principalmente no grupo tratado com 100mg/kg, deve-se a pronunciada redução da parasitemia, mostrada na figura 6.

Figura 7 - Gráficos da mortalidade de cada grupo experimental avaliada até o 40º dia após infecção por cepa Y de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Legenda: (Controle): Animais infectados e não tratados.

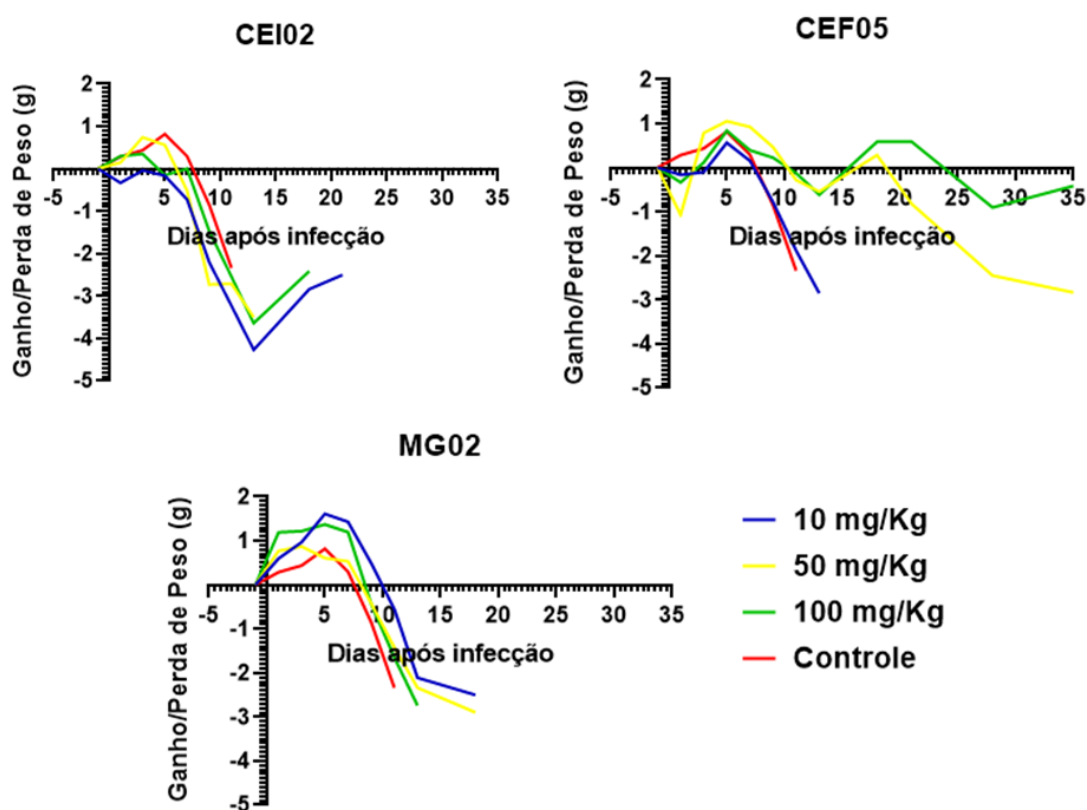
Na figura 8 estão representados os gráficos de alteração do peso médio dos camundongos em relação ao peso médio inicial de cada um dos grupos experimentais. Quando a linha encerra antes do último dia do experimento (40º dia) é devido ao óbito dos animais.

Os animais tratados com 10mg/kg de CEI02 foram os que apresentaram maior perda de peso, entretanto, o peso dos animais tratados com todas as dosagens voltou a subir a partir do dia 13, até o dia em que vieram a óbito. O grupo tratado com MG02 tiveram redução também significativa do peso, que se manteve até que os animais morressem.

Bons resultados foram verificados com os animais tratados com CEF05 nas maiores dosagens (50 e 100mg/kg), uma vez que foram os que tiveram menor perda de peso, e ao final do experimento os animais pertencentes ao grupo tratado com 100mg/kg do híbrido, estavam com o peso bastante similar ao peso inicial.

Infecções sistêmicas tipicamente podem levar a uma redução da ingestão de alimentos e um aumento do gasto energético em decorrência da debilidade da infecção (NOVAES *et al.*, 2015). Este fator pode ter refletido na perda de peso dos animais testados, onde os animais que possuíam a parasitemia mais controlada apresentaram menor perda de peso, quando comparados aos não tratados.

Figura 8 - Alteração do peso médio dos animais infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com CEI02, CEF05 e MG02 durante o experimento.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Legenda: (Controle): Animais infectados e não tratados.

Através dos testes de toxicidade e de curva de parasitemia, foi possível verificar que o composto menos tóxico e com maior atividade tripanocida dentre os testados foi o híbrido CEF05 nas dosagens de 50 e 100mg/kg.

### 6.3 AVALIAÇÃO MAIS APROFUNDADA DO COMPOSTO CEF05

Após verificar-se que o híbrido CEF05 foi o composto testado que apresentou os melhores resultados, surgiu-se a necessidade de estudá-lo *in vitro* de forma mais aprofundada.



### 6.3.1 Resultados *in vitro* do composto e do fármaco não hibridizados

A partir da definição do melhor composto dentre todos os testados (CEF05), se fez necessário avaliar melhor o CEF05 com o intuito de verificar se sua melhor resposta era devido a hibridização ou se o composto e fármaco isolados que o constituem teriam o mesmo efeito do híbrido. O composto CEF05, como já descrito anteriormente, é um híbrido formado pelo acoplamento direto entre o metronidazol e o diidroeuogenol nitrado na posição 5, ambos já haviam sido testados isoladamente *in vitro* e faziam parte da lista dos 21 compostos utilizados neste trabalho.

Tabela 4 - Valores de IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e IS do composto e fármaco isolados e hibridizados, obtidos a partir dos experimentos *in vitro*, utilizando os tratamentos contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.

Compostos/ Fármaco	IC <sub>50</sub> µg/mL±DP Epi	IC <sub>50</sub> µg/mL±DP Tripo	CC <sub>50</sub> µg/mL±DP	IS Epi	IS Tripo
Diidroeuogenol (nitrado na posição 5)	20,79 ± 2,75	29,79 ± 1,36	64,75 ± 13,95	3,11	2,17
Metronidazol	32,81 ± 1,33	30,83 ± 5,42	133,95 ± 10,25	4,08	84,8
CEF05	9,6 ± 1,65	2,29 ± 0,16	128 ± 7,29	13,35	55,98

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (IC<sub>50</sub>): concentração inibitória do tratamento capaz de matar 50% dos parasitos; (CC<sub>50</sub>): concentração citotóxica para 50% das células; (Epi): Resultados em epimastigotas; (Tripo): Resultados em tripomastigotas; (DP): Desvio padrão; (IS): Índice de seletividade.

É possível observar na tabela 4 que os resultados de IC<sub>50</sub> tanto em epimastigotas quanto em tripomastigotas do híbrido CEF05 foram bastante superiores aos do composto e fármaco isolados, por mais que o CC<sub>50</sub> do metronidazol tenha tido um resultado superior ao do híbrido, é necessária uma grande quantidade deste fármaco para matar 50% dos parasitos, diferentemente do que acontece com CEF05. Sendo assim, torna-se nítido que a ação do híbrido CEF05 possui ação superior ao composto e fármaco usados isoladamente, o que justifica seu uso nos demais testes e torna claro a importância da hibridização neste trabalho.

### 6.3.2 O composto CEF05 reduz o número de células infectadas com as formas amastigotas e a média de parasitos por célula

A partir dos resultados obtidos na triagem *in vivo*, cujo composto mais efetivo

foi o híbrido CEF05, surgiu-se o interesse em testar a ação tripanocida do mesmo contra as formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, os ensaios foram realizados e os resultados estão retratados na tabela 5.

Foi possível observar que o híbrido CEF05 foi capaz de reduzir o número de células infectadas a cada 100 células contadas quando comparados ao controle, principalmente em concentrações mais elevadas, onde a redução foi ainda mais significativa. Apesar da dosagem de 5 µg/mL ter apresentado o menor número de células infectadas, apresentou uma média maior de amastigotas por célula do que o encontrado na dosagem de 10 µg/mL, além disso, apresentou uma célula contendo mais de 50 amastigotas em uma das lamínulas, resultando em 0,5 células com >50 amastigotas, situação essa não encontrada nas lamínulas tratadas com 10 µg/mL.

Observou-se também que conforme houve a redução da dosagem de CEF05, houve também um aumento do número de células infectadas, da média de amastigotas por célula e também das células que continham mais de 50 amastigotas por célula infectada, até atingir a dosagem de 1,25 µg/mL que demonstrou menor atividade dentre os testados, mas ainda apresentou atividade quando comparado ao controle.

Quando comparados os tratamentos de CEF05 e Bz nas mesmas dosagens (10 µg/mL), resultados animadores foram observados, uma vez que o híbrido reduziu de forma mais significativa tanto o número de células infectadas quanto a média de amastigotas por célula quando comparado a administração de Bz.

Sendo assim, apesar da maior dosagem testada do híbrido não ter zerado o número de células infectadas das lamínulas, demonstrou atividade significativa principalmente nas dosagens de 10 µg/mL e 5 µg/mL quando comparados ao controle que foi infectado e não tratado. Além disso, melhores resultados foram observados no tratamento com o híbrido CEF05 contra as formas amastigotas em relação ao tratamento de Bz.

Tabela 5 - Resultados do ensaio *in vitro* utilizando amastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.

Composto/ fármaco e dosagem	Nº cél. infectadas/ 100 cél. contadas	Média de amastigotas/ cél.	Cél. com >50 amastigotas
Bz 10 µg/mL	26	2,65	0
CEF05 10 µg/mL	15	2,16	0
CEF05 5 µg/mL	9,5	7,4	0,5
CEF05 2,5 µg/mL	24,5	10,92	6,5
CEF05 1,25 µg/mL	31	11,42	10
Controle	50,5	12,97	16,5

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: Média de amastigotas/ célula, não foram incluídas nesta média as células que continham mais de 50 amastigotas; (Controle): Infectados e não tratados;

#### 6.4 RESULTADOS DO EXPERIMENTO *in vivo* FINAL

Após avaliação dos resultados da triagem *in vivo*, foi possível selecionar o composto com a maior eficácia tripanocida e menor toxicidade, portanto, o híbrido CEF05 passou a ser testado em um maior número de animais, por um período de administração mais prolongado, avaliando novos parâmetros para verificar de forma mais aprofundada o real efeito do composto e em combinação com o fármaco de referência Bz.

##### 6.4.1 O híbrido CEF05 reduz a parasitemia e aumenta a atividade tripanocida do benznidazol em terapia combinada.

Todos os tratamentos administrados proporcionaram algum nível de proteção aos camundongos quando comparados ao controle positivo (animais infectados e não tratados) que apresentaram um pico máximo de parasitemia de cerca de 1.900.000 parasitos/ 0,1mL de sangue. O grupo experimental tratado com monoterapia de CEF05 na dosagem de 50mg/kg foi o que apresentou redução menos significativa dentre os grupos tratados, com o pico máximo de parasitemia em 1.179.000 parasitos/ 0,1mL de sangue (Figura 9a).

A administração de CEF05 em monoterapia na dosagem de 100mg/kg apresentou redução significativa da parasitemia (pico máximo de 180.000 parasitos/

0,1mL de sangue), quando comparado a dosagem de 50mg/kg de CEF05 e ao grupo controle positivo, apesar disso foi o segundo tratamento menos efetivo dentre os testados (Figura 9b).

Reduções mais acentuadas no primeiro pico de parasitemia foram observadas entre os tratados com terapia combinada de Bz 50mg/kg + CEF05 50mg/kg e Bz 50mg/kg + CEF05 100mg/kg, com o primeiro pico em 3.500 e 10.500 parasitos/ 0,1mL de sangue, respectivamente, porém houve reativação em ambos os grupos a partir do 31º após infecção. O segundo pico destes tratamentos apresentou 20.000 e 5.000 parasitos/ 0,1mL de sangue para os tratados com Bz 50 + CEF05 50 e Bz 50 + CEF05 100, respectivamente. Ao final do experimento, ambos os grupos ainda apresentavam parasitemia patente.

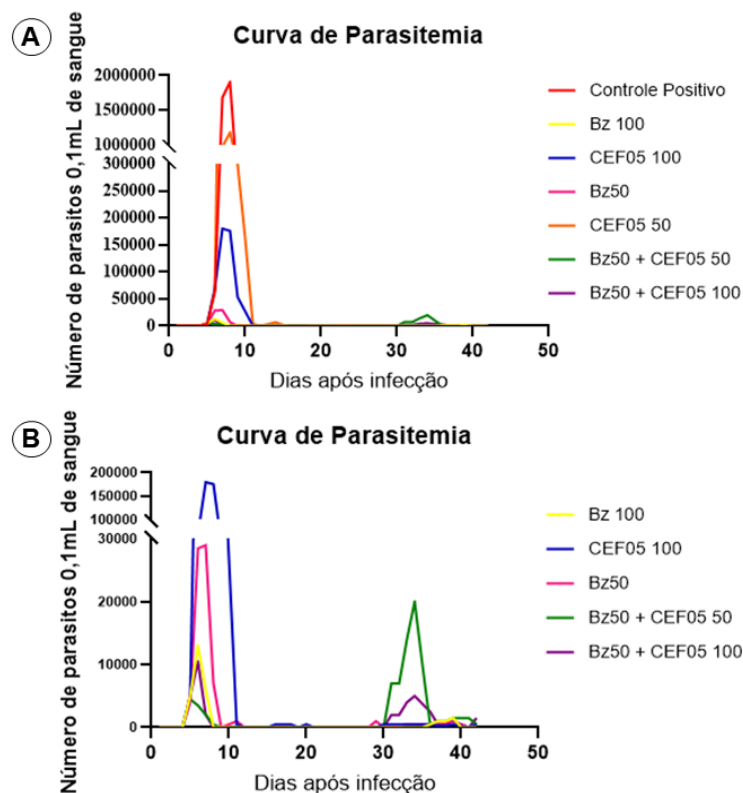
Os grupos tratados com 50 e 100mg/kg de Bz tiveram seus picos máximos com 29.000 e 13.000 parasitos/ 0,1mL de sangue, respectivamente, apesar dos tratamentos terem suprido a parasitemia por alguns dias, ambos os grupos reativaram, tratados com 50mg/kg no 20º dia e com 100mg/kg no 36º dia após infecção. Ambos os tratamentos suprimiram novamente a parasitemia ao final do tratamento.

Os tratamentos que suprimiram a parasitemia mais rapidamente foram Bz 100mg/kg e a combinação de Bz 50mg/kg + CEF05 50mg/kg com apenas 2 doses, e a combinação de Bz 50mg/kg + CEF05 100mg/kg com 3 doses de tratamento. Todos os grupos experimentais tiveram reativação dos parasitos após a supressão inicial, dentre eles, o grupo que mais demorou para reativar foi o de animais tratados com 100mg/kg de Bz, com o segundo pico em 1.500 parasitos/ 0,1mL de sangue.

Simões-Silva *et al.* (2017), sugerem que o metronidazol pode melhorar a farmacocinética do Bz quando administrados em terapia combinada, o que pode ter refletido nos bons resultados obtidos neste estudo em relação a redução da parasitemia, quando combinamos Bz com o híbrido CEF05 (metronidazol + diidroeuugenol com grupo nitrado na posição 5).

Além disso, a combinação do híbrido com Bz pode diminuir a dose do tratamento sem prejudicar o efeito tripanocida, o que pode reduzir o tempo de tratamento e os efeitos colaterais, assim como foi observado em estudo feito por Diniz *et al.* (2013) em estudo combinando do Bz com posaconazol.

Figura 9 - Curva de parasitemia dos animais tratados com monoterapia de CEF05 e combinado com Bz em comparação ao grupo controle positivo.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (A): Curva de parasitemia contendo todos os tratamentos administrados; (B): Curva de parasitemia contendo apenas os tratamentos cujos picos de parasitemia foram menores, para melhor visualização dos baixos níveis; (Controle Positivo): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (50): Animais tratados com 50 mg/kg do tratamento administrado; (100): animais tratados com 100 mg/kg do tratamento administrado.

#### 6.4.2 Avaliação do controle de cura

Para avaliação do controle de cura, três testes independentes foram realizados, sendo eles exame de sangue a fresco, hemocultura e qPCR, o animal foi considerado curado quando apresentou resultado negativo em cada um dos três testes realizados (Tabela 6).

Os melhores resultados obtidos a partir do exame de sangue a fresco foram os dos grupos tratados com 50 e 100 mg/kg de Bz, onde apenas 20% dos animais apresentaram resultado positivo para o teste, seguido pelos tratados com 50mg/kg de CEF05 com 40% dos animais positivos e 50% dos animais positivos nos grupos tratados com as terapias combinadas. Curiosamente, apesar dos resultados promissores obtidos com a administração do CEF05 na redução da parasitemia, 60% dos animais tratados em monoterapia com 100mg/kg de CEF05 reativaram naturalmente.

Quanto a hemocultura, 100% dos animais pertencentes aos grupos tratados com CEF05 100mg/kg, Bz 50mg/kg e Bz 50mg/kg + CEF05 100mg/kg, apresentaram o parasito detectado no teste desde a primeira análise (30 dias após a coleta do sangue). Na segunda análise da hemocultura (60 dias após a coleta) apenas a hemocultura de dois animais do grupo tratados com 50mg/kg de CEF05 apresentaram resultados positivos.

Após a terceira análise da hemocultura (90 dias após a coleta) foi possível verificar que a hemocultura de três animais do grupo tratado com 100mg/kg de Bz foram positivos para *T. cruzi*. Sendo assim, foi possível observar que a partir do exame de sangue a fresco e análises de hemocultura, que 50% dos animais tratados por 20 dias com Bz 100mg/kg foram positivos para *T. cruzi*.

Tabela 6 - Controle de cura dos animais infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 ou Bz e em combinação.

Grupos experimentais	Exame de sangue a fresco	Hemocultura			Total curados Exame Fresco + Hemocultura	qPCR	Nº total curados
		30	60	90			
Controle Positivo	10/10	-	-	-	-	-	0/10 (0%)
Bz 100mg/kg	2/10	0/8	0/8	3/8	5/10	0/5	5/10 (50%)
CEF05 100mg/kg	6/10	4/4	4/4	4/4	0/10	-	0/10 (0%)
Bz 50mg/kg	2/10	8/8	8/8	8/8	0/10	-	0/10 (0%)
CEF05 50mg/kg	4/10	4/6	6/6	6/6	0/10	-	0/10 (0%)
Bz 50mg/kg + CEF05 50 mg/kg	5/10	2/5	2/5	2/5	3/10	3/3	0/10 (0%)
Bz 50mg/kg + CEF05 100 mg/kg	5/10	5/5	5/5	5/5	0/10	-	0/10 (0%)

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (Controle positivo): animais infectados e não tratados; Na tabela estão representados o número de camundongos por grupo que apresentaram positivo para cada um dos testes realizados. O animal é considerado curado quando apresentar resultado negativo em todos os testes realizados.

A fim de confirmar os resultados obtidos através do exame de sangue a fresco e hemocultura, foi realizado a qPCR (PCR quantitativa em tempo real), nele os 3 animais pertencentes ao grupo tratado com Bz 50mg/kg + CEF05 50mg/kg que ainda não haviam positivado em nenhum dos testes anteriores, apresentaram resultados

positivos na qPCR, portanto, não sendo considerados curados. Já os camundongos pertencentes ao grupo tratado com Bz 100 mg/kg que não haviam apresentado resultado positivo nos testes anteriores, também não tiveram os resultados negativos na qPCR, ou seja, 50% (5/10) dos animais tratados com 100 mg/kg de Bz foram curados, nenhum dos camundongos dos demais tratamentos apresentaram cura terapêutica. Resultados similares foram obtidos por Mazzeti *et al.* (2018), onde o tratamento administrado por 20 dias com a mesma dosagem de Bz resultou em 57,1% de cura dos animais infectados com cepa Y.

Fonseca *et al.* (2021), sugerem que tratamentos mais prolongados com a dosagem padrão de Bz (100 mg/kg) podem resultar em melhores resultados quando tratando-se de cepa Y de *T. cruzi*. Esta observação foi também mostrada por Mazzeti *et al.* (2018), uma vez que os índices de cura foram para 100% dos animais infectados por cepa Y quando o tratamento foi administrado por 40 dias.

Enquanto o Bz age modificando as macromoléculas e componentes celulares (lipídios, proteínas e RNA) do parasito, por meio de espécies reativas que são geradas através de seu metabolismo nitroreductor (DOCAMPO, 1990), o metronidazol inativa o DNA do parasito e inibe sua multiplicação (o que causa morte celular), através da ligação de produtos intermediários (originários de sua redução intracelular) com o DNA (TAVARES, 2014).

Como os mecanismos de ação do Bz e do metronidazol agem de forma diferente contra os parasitos, esperava-se que a ação dos dois compostos combinados pudesse ser mais efetiva em relação à indução de cura, mais ainda por se tratar do metronidazol hibridizado com diidroeugenol nitrado na posição 5, que segundo os ensaios anteriores feitos neste trabalho apresentou resultados superiores *in vitro* em comparação ao fármaco e o composto isolados (Tabela 4). No entanto, não foi observada cura parasitológica nos grupos que receberam a administração de CEF05 em monoterapia ou em terapia combinada com Bz, o único grupo que apresentou cura parasitológica de 50% dos camundongos foi o que recebeu a administração de Bz em sua dosagem padrão (100 mg/kg) como já era esperado por tratar-se de uma cepa descrita por Filardi e Brener (1987) como parcialmente sensível ao Bz.

#### 6.4.2.1 PCR quantitativa em tempo real

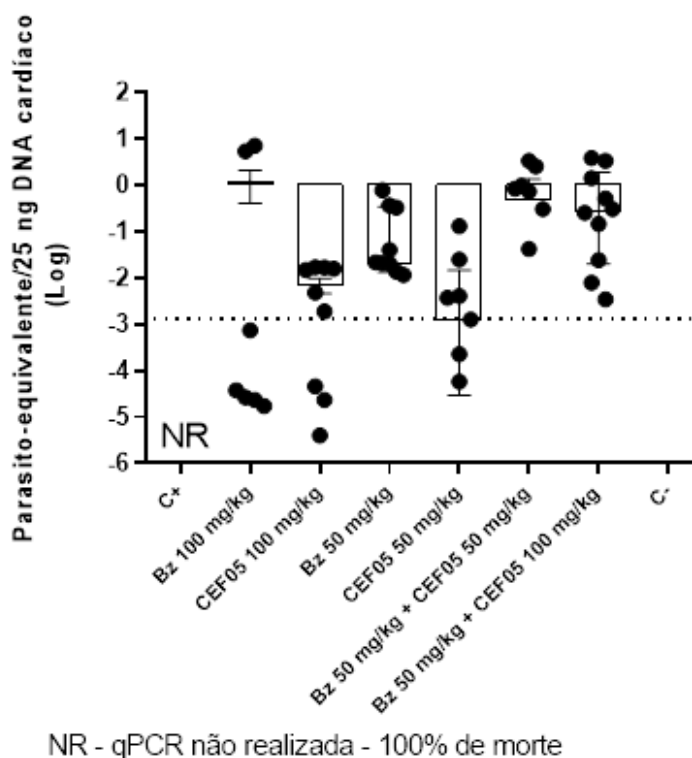
A partir das amostras cardíacas dos camundongos foi possível realizar a quantificação da carga de DNA do *T. cruzi* normalizada pela quantificação do DNA do controle endógeno TNF-alfa e expressa na unidade de concentração “parasitos-equivalentes/25 ng de DNA tecidual” como é retratado na figura 10. Observam-se que 80% (8/10) dos animais tratados com a dose padrão de Bz 100 mg/kg apresentaram níveis muito baixos de DNA do *T. cruzi* no tecido cardíaco, inferiores ao limite de quantificação acurada do ensaio (linha tracejada) sendo considerados negativos, com exceção de 20% (2/10) dos animais, os quais apresentaram uma das quantificações mais elevadas, com médias de aproximadamente 5,4 e 7,0 parasitos-equivalentes/25 ng de DNA tecidual.

Todos os animais pertencentes aos grupos tratados com Bz 50 mg/kg e as terapias combinadas, apresentaram quantificações acima do limite de quantificação acurada (sendo considerados positivos). Dentre os tratados com CEF05 100 mg/kg 70% (7/10) dos animais apresentaram resultados positivos e 44,4% (4/9) dos tratados com CEF05 50 mg/kg apresentaram resultados positivos, um dos camundongos veio a óbito antes da coleta para o ensaio, e um dos camundongos deste grupo apresentou uma quantificação no mesmo nível do limite de quantificação (ficando exatamente na reta da linha tracejada no gráfico), portanto sendo considerada sua quantificação duvidosa e sem definição para se o resultado foi positivo ou negativo.

A partir dos dados obtidos nesta análise é possível observar que o grupo tratado com CEF50 50 mg/kg apresentou resultados melhores que os tratados com Bz 50 mg/kg, além disso, a administração das terapias combinadas não resultou em sinergismo, mas sim na piora do efeito antiparasitário quando avaliamos a qPCR isoladamente.



Figura 10 - Resultados da PCR quantitativa em tempo real em tecidos cardíacos de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: Resultados positivos observados em tecidos cardíacos de camundongos de cada grupo experimental. Barras indicam médias dos grupos e seus respectivos erros padrão; Linhas tracejadas indicam o limite de quantificação acurada do ensaio; (C-): Animais não infectados e não tratados; (C+): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (NR): qPCR não realizada devido a 100% de morte dos animais antes da realização do teste.

#### 6.4.3 Tolerância dos animais ao híbrido CEF05 e benznidazol em monoterapia e em terapia combinada.

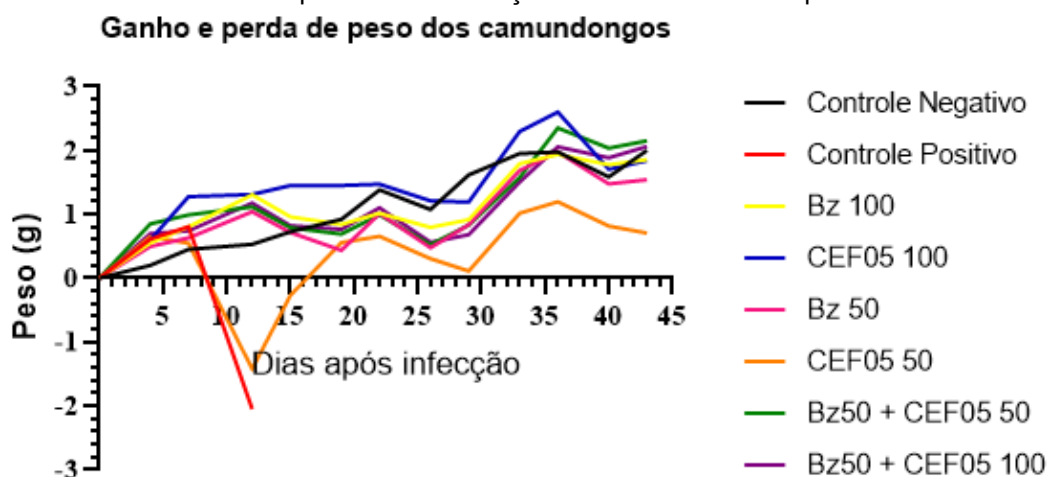
Como parâmetros para inferir a toxicidade de cada um dos tratamentos administrados, foram avaliados alteração do peso dos camundongos, alterações comportamentais e mudanças na pelagem.

Na figura 11 está representada a alteração do peso médio dos camundongos durante o experimento em relação ao peso médio inicial de cada grupo de tratamento. O grupo de animais tratados com 100mg/kg de CEF05 foi o que apresentou maior ganho de peso durante o experimento, seguido pelos tratados com as terapias combinadas, superando até mesmo o ganho de peso do grupo controle negativo (animais não infectados), porém a partir do 36º dia tiveram redução do peso médio corporal. Perda de peso mais acentuada foi observada entre os animais do grupo

controle positivo (infectados e não tratados) com redução do peso médio corporal de mais de 2g em apenas 12 dias após infecção, até virem a óbito.

Entre os grupos de animais tratados, o que apresentou maior perda de peso foram os tratados com 50mg/kg de CEF05, com redução drástica após o pico máximo de parasitemia (8º dia após infecção) até o 12º dia após infecção, onde atingiu ~1,41 g de redução de peso corporal médio, porém, após a redução da parasitemia é observado um aumento do peso, ultrapassando o peso inicial após o 16º dia (dia do início de supressão parasitária temporária).

Figura 11 - Alteração do peso médio dos animais infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com CEF05 em monoterapia e em combinação com Bz durante o experimento.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (Controle Negativo): Animais não infectados e não tratados; (Controle Positivo): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (50): Animais tratados com 50 mg/kg do tratamento administrado; (100): animais tratados com 100 mg/kg do tratamento administrado.

As células do tecido adiposo são importantes alvos para a invasão do *T. cruzi* (COMBS *et al.*, 2005; NAGAJYOTHI *et al.*, 2013). Após a invasão, os parasitos se multiplicam exponencialmente, o que pode levar estas células a lipólise, apoptose e necrose, e consequentemente a redução da massa gorda corporal dos hospedeiros. Após este processo, há a liberação dos parasitos na circulação periférica, o que leva a um aumento da parasitemia no sangue (TANOWITZ *et al.*, 2013).

Sendo assim, é possível correlacionar a perda de peso dos camundongos com o aumento da parasitemia, e após o término dos tratamentos (26º dia após infecção) e consequentemente redução da parasitemia, é possível observar que a maioria dos grupos experimentais tiveram ganho de peso.

A mudança comportamental observada nos camundongos durante o experimento foi a apatia. Os animais mais afetados foram os pertencentes ao grupo controle positivo (animais infectados e não tratados), a partir do 8º dia após infecção (pico máximo de parasitemia), os animais se encontravam prostrados e sem reação alguma quando as gaiolas eram abertas ou quando eram tocados (baixa mobilidade). Esta apatia observada permaneceu até o 11º dia quando vieram a óbito (Figura 12a).

Os grupos que não tiveram alterações comportamentais se apresentavam de forma diferente ao serem tocados ou quando a gaiola era aberta, rapidamente corriam e se escondiam em meio a maravalha, além de se movimentarem mais em outros períodos do dia e terem o hábito de se pendurarem nas grades.

Os grupos de animais tratados com CEF05 em monoterapia na dosagem de 50mg/kg, apresentaram algum nível de apatia, ao serem tocados alguns ainda corriam, mas por pouco tempo. A apatia destes animais permaneceu do 8º até o 13º dia após infecção, resultados esses com que condizem com a redução de peso dos animais neste período (Figura 11). Além disso, o retorno do comportamento normal dos camundongos está relacionado com a redução da parasitemia no mesmo período (Figura 9a).

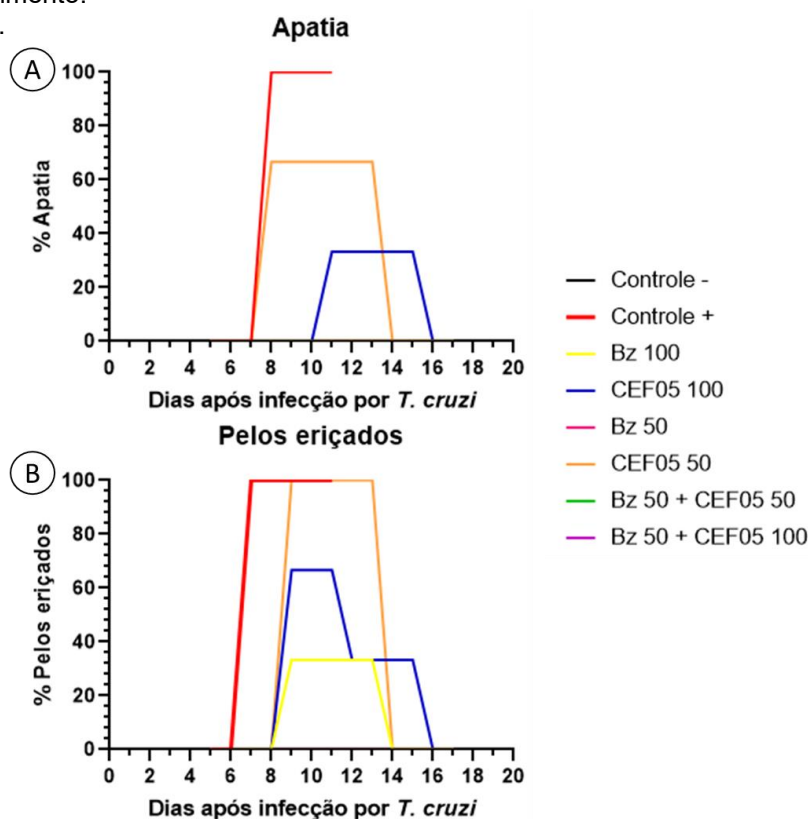
Os animais tratados com a dosagem de 100mg/kg de CEF05 apresentaram um nível mais baixo de apatia com duração de 4 dias, onde apresentaram redução da movimentação na gaiola quando estava sendo manipulada ou não, mas se movimentavam bastante ao serem tocados.

Achados de Vilar-Pereira *et al.* (2012), demonstram que a infecção por *T. cruzi* aumenta a expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) no sistema nervoso central de camundongos, levando a uma maior imobilidade dos animais e contribuindo para transtornos depressivos dos mesmos. Resultados estes que corroboram com os aqui encontrados, já que a maioria dos grupos que apresentaram altos níveis de apatia possuíam também uma parasitemia mais elevada durante os experimentos.

Além disso, os autores também demonstram que o tratamento com Bz é capaz de eliminar a apatia dos animais (VILLAR-PEREIRA *et al.*, 2012), o que também foi constatado neste trabalho, uma vez que os animais tratados com 100mg/kg de Bz, voltaram a apresentar comportamento normal após o 13º dia após infecção, e os demais grupos tratados com monoterapia ou terapia combinada de Bz não apresentaram apatia.

Vale ressaltar, que 6 animais do grupo controle vieram a óbito naturalmente no 11º dia, e todos os parâmetros avaliados indicavam que os outros 4 animais pertencentes ao grupo também morreriam no mesmo dia, portanto, foi realizada a eutanásia dos 4 animais e necropsia dos mesmos e de mais dois animais que morreram naturalmente poucos minutos antes da necropsia, além disso um animal pertencente ao grupo que recebeu a dosagem de 50mg/kg de CEF05 morreu no mesmo dia.

Figura 12 - Avaliação dos níveis de apatia e pelos eriçados dos grupos de camundongos utilizados no experimento.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (A): Apatia dos animais quantificada através de análises diárias do comportamento dos animais, alterações na quantidade de movimentação na gaiola e ao tocá-los foi levado em consideração como parâmetros de apatia. (B): Nível de pelos eriçados de cada um dos grupos estudados, quantificado a partir de análise diária da pelagem.

Outra alteração observada foi na pelagem dos animais, onde ficavam com os pelos eriçados, principalmente próximo aos dias de pico máximo de parasitemia. Os grupos com os níveis mais altos de pelos eriçados foi o grupo controle positivo, que apresentaram esta alteração na pelagem apenas um dia antes da apatia e o grupo tratados com 50mg/kg de CEF05, onde foi observada esta alteração um dia após demonstrarem apatia (Figura 12b).

Os animais tratados com 100mg/kg de CEF05 tiveram um nível de médio para alto entre os dias de maior parasitemia, mas que depois foi reduzido até que voltassem ao normal. Os dois grupos tratados com CEF05 em monoterapia retornaram a um comportamento sem apatia no mesmo dia em que a pelagem também voltou ao normal. Apesar de não ter sido observado apatia nos animais tratados com 100mg/kg de Bz, os mesmos apresentaram os pelos levemente eriçados entre o 9º e o 13º dia após infecção.

#### **6.4.4 Análises morfométricas dos órgãos**

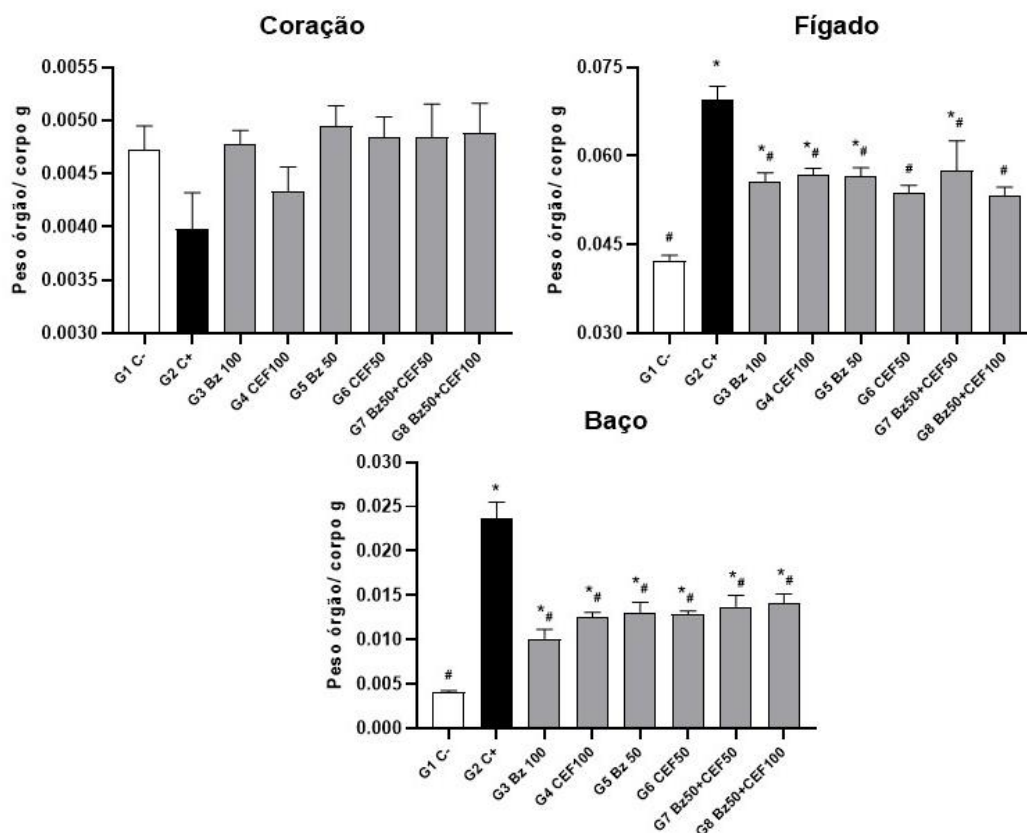
Para as análises morfométricas dos órgãos, inicialmente foram utilizados parâmetros qualitativos como o peso médio dos órgãos em relação ao peso médio corporal de cada um dos animais, como demonstrado na figura 13.

Os aspectos mais evidentes macroscopicamente no coração durante a fase aguda da DCh, em função da inflamação simultânea dos três folhetos cardíacos, principalmente o miocárdio, é o aspecto flácido e congesto do órgão, onde muitas vezes há o aumento do volume em decorrência da dilatação das cavidades. Além disso, o saco pericárdico costuma ser congesto, distendido e passa a conter maior quantidade de hidropericárdio (LOPES; CHAPADEIRO, 1997).

Entretanto, os resultados aqui obtidos demonstram que o coração dos animais do grupo controle positivo (animais infectados e não tratados) apresentaram um peso menor em relação ao peso corporal do que os demais grupos. Uma hipótese que justifica o tamanho/peso reduzido, seria porque na fase aguda da doença há muita destruição de células já que os parasitos estão se multiplicando exponencialmente, sendo assim muitas células foram rompidas, já que os animais não receberam tratamento e tiveram um pico tão elevado de parasitemia (Figura 9a).

O grupo tratado com 100mg/kg de CEF05 também apresentou leve redução de peso, e os demais grupos tratados um sutil aumento do peso quando comparados ao grupo de animais não infectados (controle negativo). Vale ressaltar que a questão da cardiomegalia não ocorre na fase aguda e sim na fase crônica tardia, uma vez que ocorre a hipertrofia das células que não foram destruídas pelos parasitos, a fim de compensar a falta das demais células, o que não é o caso dos animais estudados já que não atingiram a fase crônica da doença.

Figura 13 - Peso médio dos órgãos em relação ao peso médio corporal dos camundongos não infectados e infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: Peso médio dos órgãos em relação ao peso médio corporal de cada grupo experimental e seus erros padrão; (C-): Animais não infectados e não tratados; (C+): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (50): Animais tratados com 50 mg/kg do tratamento administrado; (100): Animais tratados com 100 mg/kg do tratamento administrado.

\* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados;

# Representa diferença estatística em relação aos animais infectados e não tratados;

As barras ligando as colunas representam diferença estatística entre os demais grupos.

Em relação aos resultados do fígado e baço, é perceptível que os animais pertencentes ao grupo controle positivo tiveram um aumento bastante significativo do peso de cada órgão em relação ao grupo de animais não infectados. Todos os tratamentos apresentaram algum tipo de proteção aos órgãos quando comparados ao controle positivo, sendo que o grupo tratado com Bz na dosagem de 100mg/kg foi o que mais reduziu o peso do baço e a combinação de Bz 50mg/kg + CEF05 100mg/kg o tratamento que menos reduziu.

Já no fígado os melhores resultados foram os obtidos pelo tratamento com Bz 50mg/kg + CEF05 100mg/kg e CEF05 50mg/kg. Mais parâmetros ainda foram avaliados para que se pudesse concluir de forma mais sólida sobre os motivos que levaram às alterações de peso de todos os órgãos.

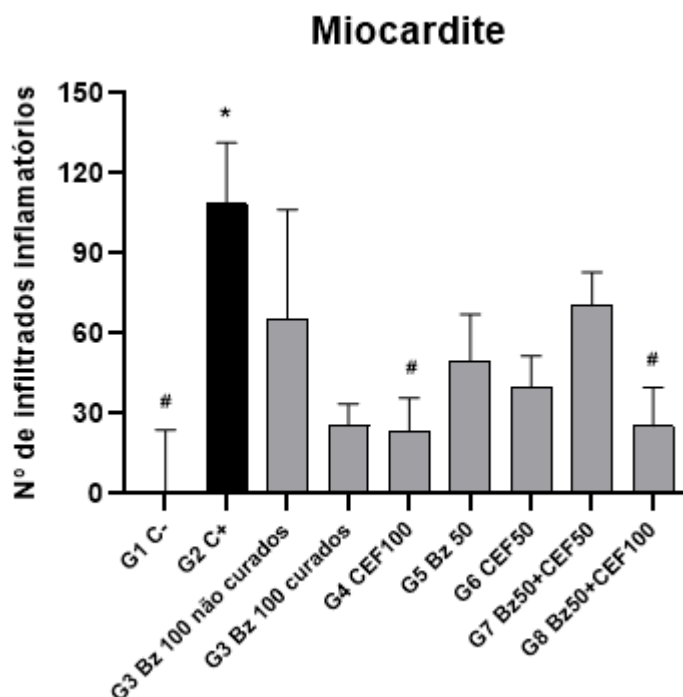
#### **6.4.5 Análise dos infiltrados inflamatórios do coração**

A partir das análises quantitativas dos corações dos camundongos de cada grupo, foi possível realizar algumas observações. O grupo com a maior quantidade de infiltrado inflamatório foi o controle positivo (animais infectados e não tratados), seguido pelos grupos onde houve a administração da combinação de 50 mg/kg de Bz + 50 mg/kg de CEF05, em seguida os tratados com monoterapia de Bz 100 mg/kg que não foram curados (50% dos camundongos do grupo, como é possível observar na Tabela 6) e os tratados com 50 mg/kg de Bz. Os únicos tratamentos capazes de reduzir de forma mais significativa os infiltrados inflamatórios em ordem crescente foram os que receberam a dosagem de 100mg/kg de CEF05, seguido pelos tratados com a combinação Bz 50 mg/kg + CEF05 100 mg/kg e em seguida, os tratados com 100mg/kg de Bz e que foram curados (Figura 14).

Sendo assim, torna-se notável uma redução significativa no número de infiltrados inflamatórios nos animais que receberam a administração de CEF05 na dosagem de 100 mg/kg seja em monoterapia ou em combinação com 50 mg/kg de Bz, números estes que apresentam diferença estatística em relação ao grupo controle positivo (animais infectados e não tratados) e que superaram a redução observada nos animais tratados com monoterapia de Bz, seja na dosagem de 50 mg/kg ou em sua dosagem padrão (100 mg/kg) mesmo considerando apenas os animais curados que receberam esta dosagem.

Algo interessante de se comparar é que o grupo de animais infectados e não tratados que foram os que apresentaram maior intensidade de miocardite, foram também aqueles que apresentaram o coração mais leve em relação ao corpo dos animais (Figura 13), o que reforça a hipótese de que por não terem sido tratados e apresentarem parasitemia muito elevada, há também intensa multiplicação dos parasitos e com isso grande rompimento das células cardíacas, o que pode acarretar na perda de massa do coração. Da mesma forma os grupos de animais que tiveram o coração com peso mais elevado apresentaram também níveis mais baixos de miocardite, o mesmo ocorreu em relação a parasitemia, já que estes animais também tiveram uma parasitemia mais controlada (Figura 9), quando comparados ao controle positivo (animais infectados e não tratados).

Figura 14 - Análise quantitativa dos infiltrados inflamatórios do coração de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: Quantificação média de infiltrados inflamatórios do coração de cada grupo experimental com seus respectivos erros padrão; A quantidade de infiltrados inflamatórios do coração (miocardite) foi calculada a partir da subtração da média de núcleos encontrada no grupo controle negativo, considerado como número normal de núcleo de células encontrado em coração saudável de camundongos. (C-): Animais não infectados e não tratados; (C+): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (50): Animais tratados com 50 mg/kg do tratamento administrado; (100): Animais tratados com 100 mg/kg do tratamento administrado;

\* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados;

# Representa diferença estatística em relação aos animais infectados e não tratados;

As barras ligando as colunas representam diferença estatística entre os demais grupos.

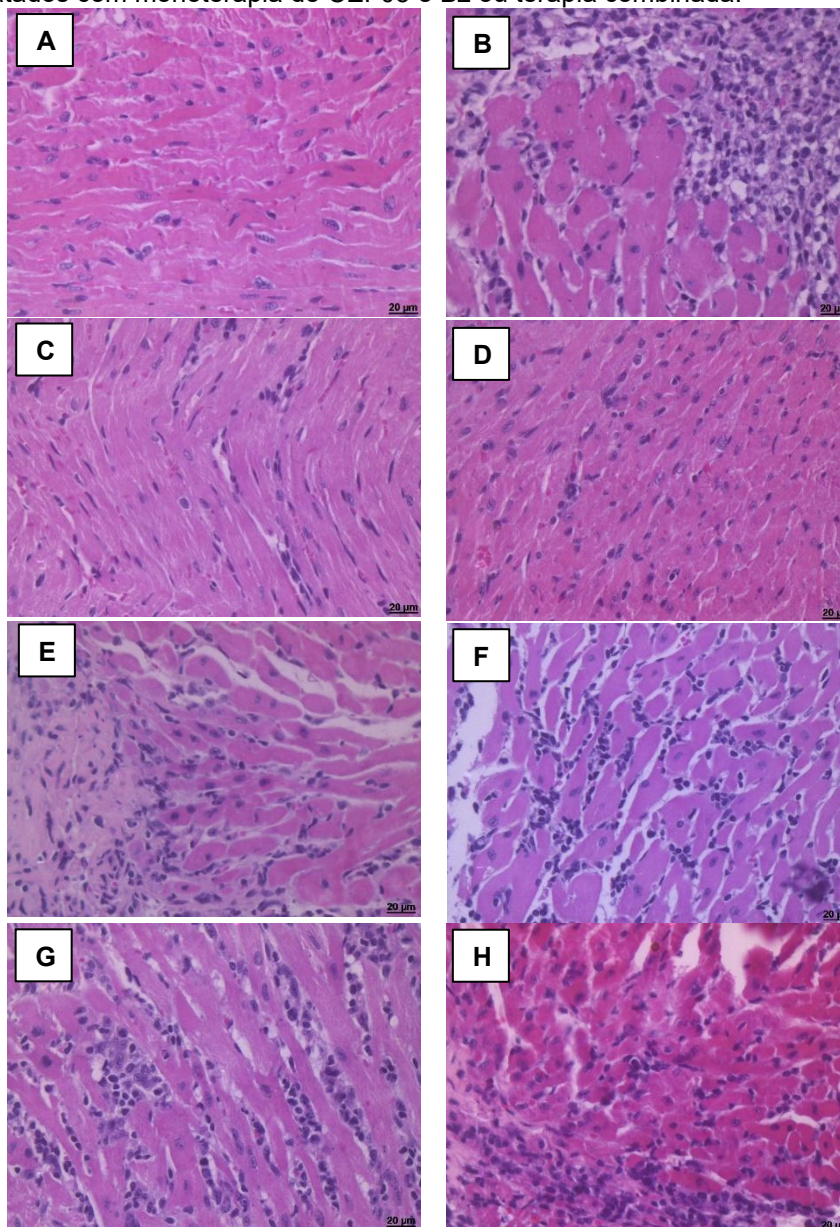
Apesar da administração da monoterapia de CEF05 não ter sido tão eficiente na redução da parasitemia (Figura 9), os animais terem apresentado apatia e pelos eriçados e o coração dos animais deste grupo terem apresentado peso mais baixo, o híbrido foi bastante eficiente em reduzir a miocardite, principalmente entre os animais que receberam a administração de 100 mg/kg.

Já os grupos que receberam as terapias combinadas reduziram de forma mais efetiva a parasitemia, tiveram a perda de peso corporal (Figura 11) e do coração quase inexpressivas e não apresentaram qualquer apatia ou pelos eriçados (Figura 12), no entanto, os animais que receberam a combinação de Bz 50 mg/kg + CEF05 50 mg/kg apresentaram miocardite mais elevada. Diferentemente, os que foram tratados com



Bz 50 mg/kg + CEF05 100 mg/kg, tiveram miocardite significativamente menor que o outro grupo de combinação com a menor dosagem de CEF05, apresentando até mesmo diferença estatística em relação ao grupo controle positivo (animais infectados e não tratados).

Figura 15 – Secções do coração de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (A): Controle negativo (não infectados); (B): Controle positivo (infectados e não tratados); (C): Grupo tratado com Bz 100mg/kg; (D): Grupo tratado com CEF05 100mg/kg; (E): Grupo tratado com Bz 50mg/kg; (F): Grupo tratado com CEF05 50 mg/kg; (G): Grupo tratado com Bz 50mg/kg + CEF05 50 mg/kg; (H): Grupo tratado com Bz 50mg/kg + CEF05 100 mg/kg.

Portanto, apesar dos grupos tratados com monoterapia de CEF05 e combinações com Bz não terem curado nenhum camundongo (Tabela 6), é possível notar efeito protetivo no coração destes animais, no entanto, nota-se também que a combinação de CEF05 e Bz nas dosagens de 50 mg/kg cada, teve efeito contrário ao esperado em relação aos infiltrados inflamatórios, sendo a administração de CEF05 em dosagens mais elevadas (100 mg/kg) mais benéfica em relação a miocardite, tanto quando administrada em monoterapia quanto em terapia combinada.

Na figura 15 é possível observar através dos cortes histológicos dos corações dos camundongos os infiltrados inflamatórios citados anteriormente, comparados ao grupo controle negativo (animais não infectados) que não apresenta nenhum grau de inflamação no tecido (A) e ao grupo positivo (animais infectados e não tratados) que foi o grupo cuja média apresentou maior quantidade de infiltrados inflamatórios (B).

#### **6.4.6 Avaliação da dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória**

Para avaliar a influência dos tratamentos administrados na resposta imune celular dos camundongos, foram dosadas no plasma dos animais as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a anti-inflamatória IL-4, a fim de comparar as dosagens de cada citocina dos animais tratados com os valores obtidos dos animais não tratados.

O grupo que apresentou os maiores níveis de produção IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi o controle positivo (infectados e não tratados), que apresentou diferença estatística em relação a todos os demais grupos. Os grupos de animais que receberam a administração das terapias combinadas foram os que mais apresentaram redução na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , (Figura 16). Dentre os grupos de animais tratados, os que apresentaram maiores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram os tratados com monoterapia de CEF05 50mg/kg.

Em relação os níveis de produção de IL-4, é possível observar que o grupo com os menores níveis desta citocina foram os tratados com 50mg/kg de Bz, seguido pelos tratados com as combinações 50mg/kg de Bz + 100mg/kg de CEF05 e 50mg/kg de Bz + 50mg/kg de CEF05, resultados estes que foram inferiores a produção de IL-4 do grupo de animais não infectados (controle negativo). Os demais grupos de animais tratados não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos controle.

Nas fases iniciais da infecção do *T. cruzi*, os macrófagos produzem citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12, essas citocinas induzem outras células, principalmente células NK a produzirem IFN- $\gamma$  (MAYA *et al.*, 2010). Neste trabalho, uma vez que os animais apresentavam uma alta de produção de TNF- $\alpha$ , apresentava também altos níveis de IFN- $\gamma$ . Além disso, tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatória tiveram resultados correspondentes nos grupos de tratamentos, como é o caso dos grupos de tratamento que apresentaram tanto IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 em níveis baixos (Bz 50 mg/kg e grupos onde houve administração de terapias combinadas) e o grupo tratado com CEF05 50 mg/kg onde todas as citocinas foram quantificadas em alta dosagem.

Com exceção do grupo Bz 100 mg/kg, altos níveis de citocinas são observados nos mesmos animais que apresentaram parasitemia mais elevada, menor quantidade de parasitos na qPCR e menor quantidade de miocardite, o oposto é observado quando a dosagem de citocinas é baixa. Possivelmente quando há muitos parasitos nos camundongos (como observado na parasitemia) ocorre uma produção mais elevada de citocinas, fazendo com que a resposta imunológica seja mais efetiva, logo reduzindo a quantidade de miocardite e de parasitos na PCR quantitativa em tempo real.

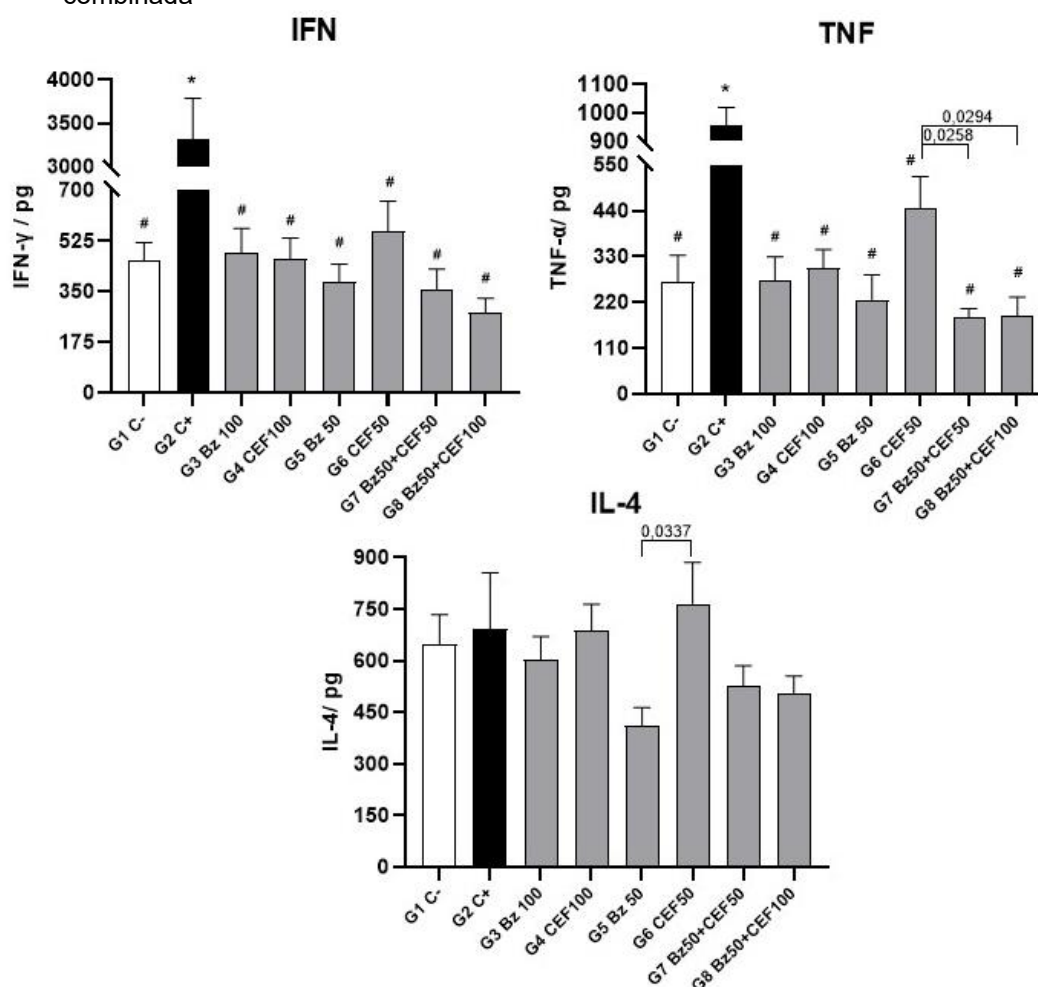
Sathler-Avelar *et al.* (2009) relatam que a resposta inflamatória estimulada por citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são muito importantes e necessárias para que haja controle parasitário, no entanto, quando a inflamação ocorre de forma muito descontrolada no coração por exemplo, pode levar a miocardite. Como pode-se observar na figura 14, há grandes chances de não ter ocorrido esta resposta inflamatória exacerbada citada pelos autores, uma vez que por mais que houvessem índices elevados de produção de citocinas pró-inflamatórias em alguns grupos, os mesmos apresentaram também uma baixa miocardite, o que remete a uma resposta inflamatória adequada entre os animais destes grupos

Citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (pertencentes ao padrão Th1), desempenham papel central na infecção aguda por *T. cruzi*, uma vez que induzem a ativação de macrófagos e estimulam a liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, o que leva a um aumento da endocitose e da morte intracelular dos parasitos, reduzindo a parasitemia. Já citocinas como IL-4 (e demais pertencentes ao padrão Th2 como IL-5, IL-10 e IL-13) atuam bloqueando as citocinas do padrão Th1,

o que permite que o parasito persista no tecido (CUNHA-NETO *et al.*, 1998; PAVANELLI, 2008).

Embora citocinas pertencentes ao padrão Th2 sejam malélicas, por aumentarem as chances de infecções e permitir a multiplicação e disseminação do *T. cruzi*, e as citocinas pertencentes ao padrão Th1 sejam consideradas benéficas e protetoras, respostas imunes exacerbadas podem induzir danos teciduais e lesões miocárdicas (MACHADO *et al.*, 2004; PAVANELLI, 2008).

Figura 16 - Dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: Dosagem média de citocinas de cada grupo experimental com seus respectivos erros padrão. (C-): Animais não infectados e não tratados; (C+): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (50): Animais tratados com 50 mg/kg do tratamento administrado; (100): Animais tratados com 100 mg/kg do tratamento administrado; \* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados; # Representa diferença estatística em relação aos animais infectados e não tratados; As barras ligando as colunas representam diferença estatística entre os demais grupos.

#### 6.4.7 Dosagem IgG total e IgG1

A partir da dosagem de anticorpos IgG total e a subclasse IgG1 por meio de ensaios de ELISA no soro dos camundongos foi possível obter os resultados demonstrados na figura 17. Tratando-se de anticorpos IgG total, é possível observar que o grupo cuja produção do mesmo foi mais baixa é o grupo de animais não infectados e não tratados (controle negativo), já o grupo que apresentou os níveis de produção mais elevados foi o de animais tratados com 50 mg/kg de CEF05, valor bastante elevado de produção de IgG total foram obtidos no grupo de animais infectados, mas não tratados (controle positivo).

Dentre os grupos de animais tratados, os que apresentaram menor produção de IgG total foram os tratados com a combinação de Bz 50 mg/kg + CEF05 100 mg/kg, superando inclusive os tratados com a dose padrão de Bz (100 mg/kg) que ficaram com o segundo menor índice de produção desta classe deste anticorpo, em seguida, os tratados com a combinação de Bz 50 mg/kg + CEF05 50 mg/kg foram os que apresentaram os melhores resultados.

Em relação a dosagem de produção de anticorpos da subclasse IgG1, alguns resultados obtidos foram similares aos anteriores, o grupo de animais não infectados (controle negativo) também apresentou a menor dosagem desta subclasse como esperado, o grupo onde mais houve a produção desta subclasse foi o de animais tratados com CEF05 na dosagem de 50 mg/kg, que apesar de apresentar resultado bastante similar do grupo de animais infectados mas não tratados (controle positivo), ainda demonstrou níveis um pouco mais elevados de produção.

Diferentemente do encontrado na dosagem de IgG total, na dosagem de IgG1 os animais tratados que apresentaram menor nível de produção desta subclasse foram os tratados com Bz 100 mg/kg, seguido por Bz 50 mg/kg e os tratados com a combinação de Bz 50 + CEF 100 mg/kg, que tiveram resultados bastante similares.

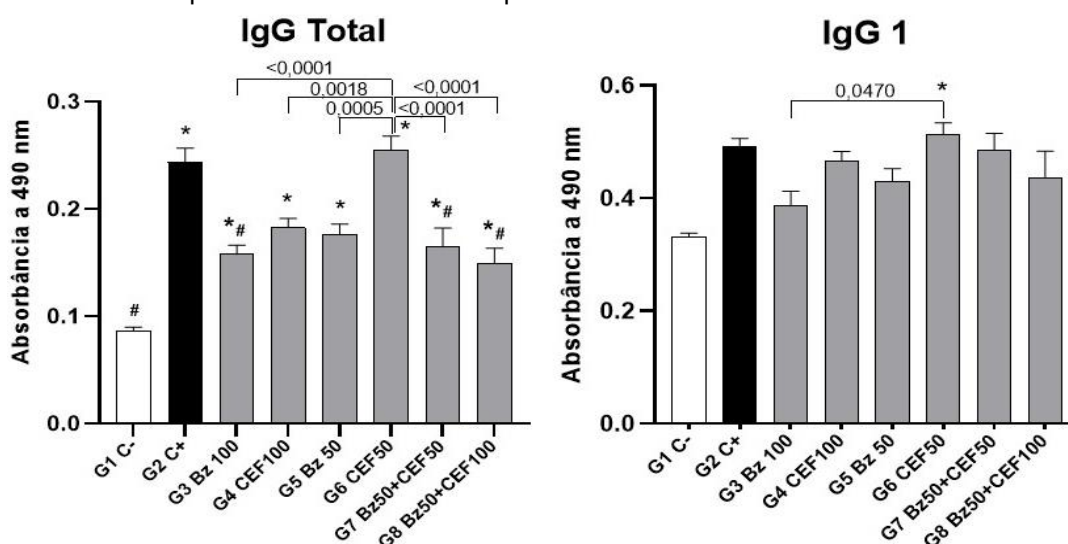
Desta forma, pode-se observar que a administração de CEF05 50 mg/kg não diminuiu os níveis de produção dos anticorpos IgG total e subclasse IgG1, quando comparamos os animais tratados com essa dosagem e o grupo de animais infectados e não tratados (controle positivo). Apesar das combinações terem apresentado resultados bastante satisfatórios no nível de produção de IgG total, o mesmo não foi observado na produção de IgG1, a administração da monoterapia de Bz 100 mg/kg reduziu de forma mais significativa os níveis de produção de anticorpos desta

subclasse, entretanto, a combinação de Bz 50 mg/kg + CEF05 100 mg/kg apresentou resultados tão satisfatórios quanto Bz 50 mg/kg, e superou a administração em monoterapia de CEF05 100 mg/kg.

De modo geral administração das combinações reduziu de forma mais significativa a produção dos anticorpos que a monoterapia de CEF05, no entanto, não apresentaram resultados tão satisfatórios na redução de IgG1, a combinação de Bz 50 mg/kg + CEF05 100 mg/kg foi mais efetiva que a combinação com menor dosagem de CEF05.

Ao observar os resultados da dosagem de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 (Figura 16) pode-se perceber que em todos os grupos onde os níveis de citocina foram elevados, também foram elevados os níveis de anticorpos IgG total e IgG1, já onde os níveis foram baixos de citocinas, também foram baixos os de anticorpos (Figura 17). Exceto pelo grupo que recebeu a administração de Bz 100 mg/kg onde os níveis de citocinas foram mais elevados, e mais baixos índices de anticorpos foram quantificados.

Figura 17 - Dosagem de anticorpos da classe IgG total e a subclasse IgG1 através do teste ELISA de camundongos não infectados e infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados com monoterapia de CEF05 e Bz ou terapia combinada.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: Produção de anticorpos IgG total e IgG1 no soro dos animais com absorbância medida a 490 nm de cada grupo experimental e seus respectivos erros padrão. (C-): Animais não infectados e não tratados; (C+): Animais infectados e não tratados; (Bz): Benznidazol; (50): Animais tratados com 50 mg/kg do tratamento administrado; (100): Animais tratados com 100 mg/kg do tratamento administrado;

\* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados;

# Representa diferença estatística em relação aos animais infectados e não tratados;

As barras ligando as colunas representam diferença estatística entre os demais grupos.

Os animais que receberam a administração de CEF05 50 mg/kg foram os animais tratados que apresentaram as dosagens mais elevadas de produção de IgG total e IgG1, a maior dosagem de todas as citocinas (Figura 16), maior perda de peso durante os experimentos (Figura 11) os que mais demonstraram apatia e pelos eriçados, no entanto, apresentam miocardite menos elevada. Os animais que receberam esse tratamento apresentaram também parasitemia elevada, e segundo Araújo-Jorge e Castro (2000), anticorpos que são produzidos pelas células B convencionais são totalmente essenciais no controle parasitário e para que o hospedeiro sobreviva, portanto, a produção dos anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG podem ter colaborado para a redução da parasitemia (Figura 9) e sobrevivência dos camundongos deste grupo, como foi observado. Além disso, estudo feito por Brener e Krettli (1990) indicam que camundongos que geneticamente produzem menos anticorpos apresentam maior mortalidade e parasitemia do que camundongos que são bons produtores de anticorpos.

#### **6.4.8 Principais resultados do experimento *in vivo* final compilados**

Na tabela 7 estão representados os principais resultados obtidos neste estudo a partir dos experimentos *in vivo* final de forma compilada. Foi possível observar certa correspondência em alguns resultados, exceto no grupo de animais tratados com Bz 100 mg/kg. É possível observar que a parasitemia teve seu índice inversamente proporcional aos níveis obtidos na qPCR e análise de miocardite, já em relação às análises imunológicas envolvendo dosagem de citocinas e anticorpos da classe IgG total e subclasse IgG1, pode-se perceber que os índices são proporcionais em todas as dosagens.

A teoria atual mais aceita em relação às lesões teciduais progressivas, é que elas são ocasionadas pelos mecanismos imunológicos de controle da carga parasitária (TARLETON, 1995), no entanto, não foi possível encontrar relação entre as respostas imunológicas avaliadas no presente trabalho e os danos teciduais no coração (através de infiltrados inflamatórios).

Os camundongos que receberam a administração de CEF05 em monoterapia apesar de apresentarem parasitemia mais elevada, apresentaram posteriormente bons resultados em relação a qPCR e miocardite, achados estes que corroboram com



a alta dosagem de citocinas e anticorpos encontrados nos ensaios, uma vez que demonstra tentativa do corpo do hospedeiro ao tentar combater o parasito.

A administração de Bz 100 mg/kg obteve resultados bastante positivos, uma vez que reduziu parasitemia, número de parasitos na qPCR e miocardite, teve boa ação das citocinas tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, no entanto uma baixa dosagem de anticorpos, o que pode ser explicado pelo controle parasitário rápido que ocorreu logo no início da infecção.

Já os tratados com Bz 50 mg/kg e com as terapias combinadas apresentaram resultados iniciais interessantes ao reduzir a parasitemia, no entanto não preveniu a miocardite e apresentou altos índices de parasito na qPCR. Diferentemente dos demais grupos citados anteriormente, estes apresentaram baixos níveis de ambas as citocinas e anticorpos.

Estes resultados indicam que possivelmente controle parasitário inicial (em caso de falha terapêutica) seja prejudicial, uma vez que pode haver a reativação de parasitos e aumento da miocardite posteriormente. Já respostas com uma quantidade de parasitos mais elevada inicialmente pode induzir respostas imunológicas mais efetivas, induzindo maior produção de citocinas e anticorpos, que a longo prazo podem impedir que haja a reativação dos parasitos e reduzindo a quantidade de infiltrados inflamatórios do coração do hospedeiro (miocardite).

Além disso, as análises indicam que a monoterapia de CEF05 apresentou melhores resultados do que a monoterapia de Bz 50 mg/kg e as terapias combinadas, o que pode ser devido a um possível efeito anti-inflamatório do Bz quando administrado em menor dosagem.

A partir das análises realizadas neste estudo, foi possível verificar que dentre a série de compostos testados em experimentos *in vitro* e *in vivo*, o híbrido CEF05 (metronidazol acoplado ao diidroeugenol na posição 5) foi o que se mostrou mais eficaz, quando testados o composto e o fármaco (metronidazol e diidroeugenol nitrado na posição 5) isoladamente, foi possível observar que os dois hibridizados são muito mais efetivos do que ambos isolados, o que justifica o uso do híbrido. Além disso, CEF05 foi mais eficaz na redução de células infectadas por amastigotas e na média de amastigotas por célula que o fármaco Bz na mesma dosagem.



Tabela 7 – Principais resultados compilados do experimento *in vivo* final.

Grupos experimentais	Parasitemia	qPCR	Miocardite	Citocinas		IgG Total e IgG1
				IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$	IL-4	
CEF05 50 e 100mg/kg	↑	↓	↓	↑	↑	↑
Bz 100mg/kg	↓	↓	↓	↑	↑	↓
Bz 50mg/kg	↓	↑	↑	↓	↓	↓
Terapias combinadas	↓	↑	↑	↓	↓	↓

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (Bz): Benznidazol; Na tabela estão representados os principais resultados dos experimentos *in vivo* final, as setas para cima indicam altos índices/ níveis de cada resultado, já as setas para baixo representam baixos índices/ níveis.

Apesar da monoterapia de CEF05 não ter eliminado *T. cruzi* dos hospedeiros, foi capaz de reduzir a parasitemia dos animais, evitou a mortalidade, reduziu a perda peso dos animais e potencializou o efeito tripanocida do Bz 50mg/kg, evidenciado pela parasitemia, quando administrados em terapia combinada, o que é bastante importante já que muitos pacientes descontinuam o tratamento com Bz devido a grande quantidade de efeitos colaterais do fármaco ao ser administrado em sua dose padrão (100mg/kg).

A monoterapia de CEF05 foi capaz de reduzir significativamente os infiltrados inflamatórios do coração dos camundongos, quando comparados ao grupo controle positivo, porém, ao administrar a combinação de Bz 50 mg/kg + CEF05 50 mg/kg foi observado acúmulo de células inflamatórias em mais abundância, assim como foi observado entre os animais tratados com 50mg/kg de Bz em monoterapia. Entretanto, ao aumentar a dosagem de CEF05 na terapia combinada (Bz 50 mg/kg + CEF05 100 mg/kg) e na monoterapia (CEF05 100 mg/kg) foi possível observar resultados animadores quanto a redução da miocardite, apresentando ambos os grupos diferença estatística em relação ao grupo controle positivo (animais infectados e não tratados).

A administração de CEF05 na dosagem de 100mg/kg reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias nos animais, com níveis similares ao do grupo controle negativo (não infectados), o que pode estar relacionado com a redução da parasitemia observada. Apesar do híbrido não ter reduzido de forma significativa a produção de

IgG1, as combinações do híbrido com o Bz e a monoterapia de CEF05 100 mg/kg foi capaz de reduzir a produção de IgG total, as combinações apresentaram diferença estatística entre seus resultados e o do grupo controle positivo (animais infectados e não tratados).

## 7 CONCLUSÃO

Dentre os compostos testados o que se mostrou mais eficaz foi o híbrido CEF05, tendo sido até mesmo mais eficaz que o fármaco Bz contra as formas amastigotas. Apesar de nos experimentos *in vivo*, apenas a dosagem de 100 mg/kg de Bz ter sido o único tratamento capaz de induzir a cura parasitológica de 50% dos camundongos, o híbrido CEF05 foi capaz de reduzir a parasitemia, a perda de peso dos animais e os infiltrados dos corações, além disso, normalizou a produção de citocinas pró-inflamatórias. CEF05 também potencializou os efeitos tripanocidas do Bz, reduziu a produção de IgG total e preveniu a apatia e pelos eriçados quando administrado em terapia combinada com Bz. Em relação a perspectivas futuras, novos estudos podem ser realizados com maior duração para avaliar a mortalidade dos animais e a progressão da doença, além de estudos utilizando a combinação de CEF05 com a dosagem padrão de Bz (100mg/kg) para avaliação dos parâmetros aqui utilizados.

## REFERÊNCIAS

- APT, W. *et al.* Chagas disease: a global neglected disease that require continuous medical education. **J Community Medicine Health Education**, v. 4, n. 260, p. 1-6, 2013.
- APT, W. *et al.* Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 133-138, 1998.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. Resposta do hospedeiro à infecção. *In*: ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. (Org.). **Doença de Chagas: manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches underinvestigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opin on Investig Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225-1237, June, 2014.
- BASTOS, C. J. C. *et al.* Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.
- BENDESKY, A.; MENÉNDEZ, D. Metronidazol: una visión integral. **Revista de la Facultad de Medicina UNAM**, Coyoacán, v. 44, n. 6, p. 255-259, nov./dic. 2001.
- BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas cardiomyopathy: clinical presentation and management in the Americas. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31-47, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Balço das ações da saúde**. Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 3. ed. Brasília, 2019.
- BRENER, Z. *et al.* Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 6, p. 389-96, 1962.
- BRENER, Z.; KRETTLI, A.U. Immunology of Chagas' disease. *In*: WYLE, D. J. (Org.). **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological, and Molecular Aspects**. New York: W. H. Freeman and Company, 1990.
- CERUELOS, A. H. *et al.* Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 397-401, 2019.
- CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomíaze Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*. n. gen., n. SP. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Processos patojenicos da tripanozomiase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 5-36, 1916.

COMBS, T. P. *et al.* The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24085-24094, 2005.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 641-645, 2011.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

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

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 2, p. 145-154, 2012.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 549–554, 2009.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 30-33, jan./mar, 2003.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 129, n. 1, p. 53-59, June, 2003.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.

DE BEULE, K.; GESTEL, J. V. Pharmacology of Itraconazole. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 27-37, 2001.

DE CASTRO, S. L.; SANTA-RITA, R. M.; EINICKER-LAMAS, M. **Quimioterapia Experimental**. In: ARAÚJO-JORGE, T. C.; DE CASTRO, S. L. (Org.). Doença de chagas: manual para experimentação animal. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000.

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

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375-379, mai./jun. 2011.

DINIZ, L. de F. **Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***. 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

DINIZ, L. de F. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, n. 1, p. 1-27, 1990.

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

FONSECA, K. da S. *et al.* Benznidazole Treatment: Time-and Dose-Dependence Varies with the *Trypanosoma cruzi* Strain. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 729, 2021.

GALVÃO, C. A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 511-30, 2003.

HARIA, M.; BRYSON, H. M.; GOA, K. L. Itraconazole. **Drugs**, v. 51, n. 4, p. 585-620, 1996.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261-1266, Feb. 2012.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Validation of *in-vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. 2021. *In*: AL-MAJED, A. (Org.). **Profiles of drug substances, excipients and related methodology**. Cambridge, Academic Press, 2021.

KEATING, G. M. Posaconazole. **Drugs**, v. 65, n. 11, p. 1553-1567, 2005.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical

function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.

KROPF, S. P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L. O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, p. 347-365, 2000.

LENTA, B. N. *et al.* *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 8-12, 2007.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. *In*: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MANDAL, S. Epidemiological Aspects of Chagas Disease - a Review. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2014.

MARTINS, T. A. F. *et al.* Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-12, June. 2015.

MAYA, J. D. *et al.* Chagas disease: Present status os pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 323-331, 2010.

MAZZETI, A. L.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. **Benznidazol em combinação com alopurinol: aumento da atividade anti- *Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

MAZZETI, A. L. *et al.* Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: a pre-clinical study. **Biochemical Pharmacology**, v. 148, p. 213-221, 2018.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. The use of posaconazole against Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 397-407, 2015.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 3, p. 886-894, 2013.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NOVAES, R. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2873-2881, 2015.

NOVAES, R. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270-279, 2013.

OLIVEIRA, M. de F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, set. 2008.

PACHECO, L. V. *et al.* Transmissão oral da doença de Chagas: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1 - 11, 2021.

PAVANELLI, W. R. Citocinas e óxido nítrico na Doença de Chagas. **Biosaúde**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 147-146, jul./dez. 2008.

PELOZO, M. F. *et al.* Synthesis of New Hybrid Derivatives from Metronidazole and Eugenol Analogues as Trypanocidal Agents. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 421-434, 2021.

POIRIER, J. M., CHEYMOL, G. Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 35, n. 6, p. 461-473, 1998.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet**. v. 1, p. 92-100, Sept. 2001.

RASSI JR, A. *et al.* Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 799-808, 2006.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARTIN-NETO J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, Apr. 2010.

ROMAÑA, C. Acerca de um sintoma inicial de valor para o diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas: La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral: hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad, 1935. *In*: CARVALHEIRO, J. da R. *et al.* (Org.). **Clássicos em doença de Chagas: história e perspectivas no centenário da descoberta**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009.

SAMUELSON, J. Why Metronidazole Is Active against both Bacteria and Parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1533-1541, July. 1999.

SATLER-AVELAR, R. *et al.* Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 2, p. 103-113, 2008.



SILVA, A. T. de A. **Síntese de Pró-Fármacos Derivados de Metronidazol**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2002.

SILVA, C. F. *et al.* The biological *in vitro* effect and selectivity of aromatic dicationic compous on *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 105, p. 239-245, 2010.

SIMÕES-SILVA, M. R. *et al.* Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono-and combined therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 46-53, 2017.

SOARES SOBRINHO, J. L. *et al.* Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R.; SEGURA, E. L. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 167-180, 2009.

SOUZA, W. de; VIDAL, J. **Taxonomia morfológica: métodos morfológicos**. Fiocruz, 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/taxonomia/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina-Buenos Aires-**, v. 59, p. 147-165, 1999.

SYDNEY, M.; FINEGOLD, M. D. Metronidazole. **Annals of Internal Medicine**, v. 93, n. 4, p. 585-587, 1980.

SYKES, M. L.; AVERY, V. M. Development and application of a sensitive, phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 215-228, Dec. 2015.

TANOWITZ, H. B. *et al.* Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 76, p. 235-250, 2011.

TARLETON, R. L.; CURRAN, J. W. Is Chagas disease really the “new HIV/AIDS of the Americas”? **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 10, p. 1-2, Oct. 2012.

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitology Today**, v. 11, n. 1, p. 7-9, 1995.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

TYLER, K. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *In*: TYLER, K. M.; MILES, M. A. (Org.). **American Trypanosomiasis**. Boston: Springer Science & Business Media, 2002.

URBINA, J. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 27-38, 2003a.

URBINA, J. A. *et al.* Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 39-48, 2003b.

VALENTE, S. A. da S.; VALENTE, V. da C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 395-398, 1999.

VARGAS, A. *et al.* Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, 2018.

VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **British Medical Bulletin**, v. 41, n. 2, p. 105-114, 1985.

VIEGAS-JUNIOR, C. *et al.* Molecular Hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VILAR-PEREIRA, G. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 7, p. 1136-1149, 2012.

VIOTTI, R. *et al.* Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 58, n. 9, p. 1037-1044, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Genève, 2020. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 30 Oct. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Genève, 2018. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1). Acesso em: 26 Jan. 2021.