



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade De Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Hidroximetilnitrofural (NFOH): Estudo da Atividade em Fase Aguda e Crônica da doença de Chagas em Modelo Animal, infectados com cepas Bolívia (TcI) e CL Brener luc bioluminescente (TcVI) de *T. cruzi***

Cauê Benito Scarim

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

**Araraquara**

**2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



Faculdade De Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Hidroximetilnitrofural (NFOH): Estudo da Atividade em Fase Aguda e Crônica da doença de Chagas em Modelo Animal, infectados com cepas Bolívia (TcI) e CL Brener luc bioluminescente (TcVI) de *T. cruzi***

Cauê Benito Scarim

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área De Pesquisa E Desenvolvimento De Fármacos E Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

**Araraquara**

**2020**

---

**S286h** Scarim, Cauê Benito.  
Hidroximetilnitrofural (NFOH): Estudo da Atividade em Fase Aguda e Crônica da doença de Chagas em Modelo Animal, infectados com cepas Bolívia (TcI) e CL Brener luc bioluminescente (TcVI) de *T. cruzi* / Cauê Benito Scarim. – Araraquara: [S.n.], 2020.  
188 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Chung Man Chin.

1. Doença de Chagas/agudo. 2. Doença de Chagas/crônico. 3. *T. cruzi*.  
4. Hidroximetilnitrofural. 5. Benznidazol. 6. Cepa Bolívia. 7. Cepa CL Brener luc bioluminescente. I. Chung, Man Chin, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030078P6**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

---

**Cauê Benito Scarim**

**Hidroximetilnitrofural (NFOH): Estudo da Atividade em Fase Aguda e Crônica da doença de Chagas em Modelo Animal, infectados com cepas Bolívia (TcI) e CL Brener luc bioluminescente (TcVI) de *T. cruzi***

Essa Tese foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

APROVADO

REPROVADO

**Profa. Dra. Chung Man Chin**

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Fármacos e Medicamento,  
UNESP, Araraquara/SP)  
(Presidente/Orientadora)

**Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira**

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, USP, São Paulo/SP)

**Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Biociência e Biotecnologias  
Aplicadas à Farmácia, UNESP, Araraquara/SP)

**Prof. Dr. Edmo Atique Gabriel**

(União das Faculdades dos Grandes lagos, Departamento de Medicina, São José  
do Rio Preto/SP)

**Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque**

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas,  
Toxicológicas e Bromatológicas USP, Ribeirão Preto/SP)

Araraquara, 24 de março de 2020.

---

## DEDICATÓRIA

*“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para consegui-lo”  
(Dalai Lama)*

Este trabalho é dedicado a meus avós Divaldo e Antônia, Thomaz e Maria Rosa,  
aos meus pais Antonio Roberto e Débora Renata,  
meu irmão Caio, e minha esposa Paula  
que um dia sonharam e hoje compartilham comigo este importante momento.  
Obrigado pela oportunidade, pelo apoio, incentivo,  
suporte, confiança e, principalmente, amor incondicional.

*“Perder tempo em aprender coisas que não interessam,  
priva-nos de descobrir coisas interessantes”  
(Carlos Drummond de Andrade)*

---

## EPÍGRAFE

*“Knowledge is like a garden,  
if not cultivated, it can't be harvested.”  
(African proverb)*

*“I'm not strange, weird, off, not crazy,  
my reality is just different from yours”  
(Lewis Carroll)*

---

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Roberto e Débora Renata, pela educação que me deram, por sempre me apoiarem e me oferecer às condições para que eu pudesse estudar e chegar cada vez mais longe, devo a eles tudo que conquistei em minha vida.

Aos meus irmãos Caio e Glauco, por representarem uma fonte inspiratória em minha vida.

A minha querida esposa Paula, pelo companheirismo, eterno amor, apoio, cumplicidade, carinho e principalmente sua infinita paciência durante a realização deste trabalho.

A minha orientadora, Profa. Dra. Chung Man Chin, pelos ensinamentos, orientação, amizade, apoio e pela confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade, por toda a ajuda, colaboração e paciência para a realização dos ensaios histopatológicos deste projeto.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, e a todos do Laboratório de Parasitologia por permitir a utilização de seu laboratório para a realização de ensaios biológicos.

A Profa. Dra. Rosangela Peccinini e a todos do Laboratório de Toxicologia por permitir a utilização de seu laboratório para a realização de ensaios bioquímicos.

Aos pesquisadores Amanda Fortes Francisco e John M. Kelly da *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (LSHTM, Londres - UK) por me aceitarem em vossos laboratórios e pela confiança depositada para realização deste trabalho.

A CAPES (PDSE - 88881.189584/2018-01), CNPQ e FAPESP (2016/10847-9), pelo apoio financeiro, através do oferecimento de bolsa de estudos.

*“Não tenhamos pressa, mas não percamos tempo”*

*(José Saramago)*

---

## RESUMO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose endêmica em 21 países das Américas do Sul e Central, apontada como uma grave doença parasitária resultante da infecção por *Trypanosoma cruzi* que utiliza insetos triatomíneos como vetores. Existem dois fármacos para o tratamento dessa enfermidade, o nifurtimox (NFX) e o benznidazol (**BNZ**), ativos apenas na fase aguda da doença, sendo que no Brasil apenas o **BNZ** é comercializado. Em busca de novas alternativas para o tratamento, destaca-se o hidroximetilnitrofurural (**NFOH**), ativo contra as formas tripomastigotas e amastigotas em ensaio *in vitro* e *in vivo* (agudo). O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do **NFOH** em ensaios *in vivo* na fase aguda e crônica utilizando cepa Bolívia e cepa CL Brener bioluminescente. O estudo com a cepa Bolívia em fase crônica utilizou um ciclo de imunossupressão de 14 dias consecutivos com dexametasona (5 mg/kg) para verificação da reativação da parasitemia, enquanto o ensaio (agudo e crônico) com cepa Brener CL bioluminescente, aplicando-se 2-3 ciclos de imunossupressão com ciclofosfamida (200 mg/kg, intervalos de quatro dias entre as doses). Os resultados demonstraram efeito semelhantes nos tratamentos com **NFOH** (150 mg/kg/ 20 dias) e **BZN** (100 mg/kg /20 dias) na fase aguda com cepa Bolívia, com eliminação da parasitemia e diminuição dos infiltrados inflamatórios e ninhos amastigotas. No ensaio de fase crônica com cepa Bolívia, o **NFOH** (150 mg/kg/ 60 dias) foi eficaz em eliminar a parasitemia após o ciclo de imunossupressão, negatização confirmada por xenodiagnóstico, bem como reduziu infiltrados inflamatórios e ninhos amastigotas. No ensaio com a cepa CL Brener luc bioluminescente, os resultados mostraram reativação da infecção quando tratados com **NFOH** (100 mg/kg/ 5 dias), após dois ciclos de imunossupressão. No modelo utilizando a cepa CL Brener luc bioluminescente, o **NFOH** (100 mg/kg), exibiu 100% de cura dos animais, mantendo-se inalterado após dois ciclos de imunossupressão. Entretanto, depois do 3º ciclo, houve reativação em dois dos seis animais analisados, confirmando 50% de cura pelo ensaio *ex vivo*. O **BZN** (100 mg/kg), no mesmo protocolo, demonstrou 100% de cura. A análise histopatológica dos órgãos (com as duas cepas) mostrou que o **NFOH** reduziu o número de infiltrados inflamatórios e fibrose cardíaca e no tecido hepático foi capaz de reduzir a quantidade de infiltrados inflamatórios e colágeno total, valores significativamente diferentes do **BZN**, demonstrando, que **NFOH** é menos tóxico que o **BZN**. Os resultados demonstram o potencial do candidato a fármaco **NFOH** e mais estudos devem ser realizados para obtenção de negatização total após vários ciclos de imunossupressão.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas/agudo, doença de Chagas/crônico, *T. cruzi*, hidroximetilnitrofurural, benznidazol, cepa Bolívia, cepa CL Brener luc bioluminescente.



## ABSTRACT

American trypanosomiasis or Chagas disease is an endemic zoonosis in 21 countries of South and Central America, and is a serious parasitic disease resulting from infection by the hemoflagellate parasite called *Trypanosoma cruzi*, which uses triatomine insects as vectors. There are two drugs for the treatment of this disease, nifurtimox (NFX) and benznidazole (BNZ), active only in the acute phase of the disease, and in Brazil only BNZ is marketed. In the search for new alternatives for treatment, hydroxymethyl nitrofurazone (NFOH), active against trypomastigotes and amastigotes *in vitro* and *in vivo* tests (acute), stands out. The objective of this work was to study the effects of NFOH *in vivo* and acute phase studies using Bolivia strain and bioluminescent CL Brener strain. The study with the chronic Bolivia strain used a 14-day cycle of immunosuppression with dexamethasone (5 mg/kg) to verify the reactivation of parasitemia, while the test (acute and chronic) with bioluminescent Brener CL strain were applied in 2-3 cycles of immunosuppression with cyclophosphamide (200 mg/kg, four-day intervals between doses). The results showed a similar effect in treatments with NFOH (150 mg/kg/ 20 days) and BZN (100 mg/kg/ 20 days) in the acute phase with strain Bolivia, with elimination of parasitemia, and decrease of parasite infiltrates in histopathological analysis as well. In the chronic phase assay with strain Bolivia, NFOH (150 mg/kg/ 60 days) was effective in eliminating parasitemia after the immunosuppressive cycle, which was confirmed by xenodiagnoses, and was able to reduce the parasite infiltrates in histopathological analysis as well. In the bioluminescent Brener CL strain, the results showed reactivation of the infection when treated with NFOH (100 mg/kg/ 5 days), after two cycles of immunosuppression. In the model using bioluminescent Brener strain, NFOH (100 mg/kg) showed 100% cure of the animals, remaining unchanged after two cycles of immunosuppression. However, after the 3rd cycle, there was reactivation in two of the six animals analyzed, confirming 50% cure by the *ex vivo* assay. BZN (100 mg/kg), in the same protocol, showed 100% cure. Histopathological analysis of the organs (with both strains) showed that NFOH reduced the number of inflammatory infiltrates and cardiac fibrosis and in the hepatic tissue was able to reduce the amount of inflammatory infiltrates and total collagen values significantly different from BZN, demonstrating that NFOH is less toxic than BZN. The results demonstrated the potential of the NFOH as drug candidate and further studies should be performed to obtain total negativity after several cycles of immunosuppression.

**Keywords:** Chagas disease, *T. cruzi*, hydroxymethyl nitrofurazone, benznidazole, CL Brener luc bioluminescent strain, Bolivia strain.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DN = Doenças negligenciadas

EMA = European Medicines Agency

FDA = Food and Drug Administration

DNDi = Drugs for Neglected Diseases initiative

MSF = Médicos Sem Fronteiras

*T. cruzi* = *Trypanosoma cruzi*

TGI = trato gastrointestinal

SNA = sistema nervoso autônomo

SNE = sistema nervoso entérico

SNS = sistema nervoso simpático

SNP = sistema nervoso parassimpático

NF = nitrofurais

NFOH = hidroximetilnitrofurais

BZN = benznidazol

n = número de animais por grupo

N = número total de animais no experimento

dpi = dias pós-infecção

dpt = dias pós tratamento

INT = grupo infectado não tratado

NI = grupo não infectado

IBZN = grupo infectado tratado com benznidazol

INFOH = grupo infectado tratado com hidroximetilnitrofurais

TGO = transaminase glutâmico-oxalacética

TGP = transaminase glutâmico-pirúvica

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores de absorbância, em triplicata, para confecção de curva de calibração para TGO (U/L). .....	84
<b>Tabela 2</b> - Valores de absorbância, em triplicata, para confecção de curva de calibração para TGP (U/L).....	85
<b>Tabela 3</b> - Resumo dos ensaios realizados em cada um dos quatro experimentos. (*) agudo, cepa Bolívia; (&) crônico, cepa Bolívia; (#) agudo, cepa Brener CL bioluminescente; (α) crônico, cepa CL-Brener luc bioluminescente.....	87
<b>Tabela 4</b> - Resultados do acompanhamento parasitêmico e da taxa de mortalidade durante o experimento I – Swiss (cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> ).....	89
<b>Tabela 5</b> - Resultados do acompanhamento parasitêmico e taxa de mortalidade durante o experimento I – C57Bl6 (cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> ). .....	96
<b>Tabela 6</b> - Resultados do acompanhamento parasitêmico e taxa de mortalidade durante o experimento II – Balb/c (cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> ). .....	103
<b>Tabela 7</b> - Xenodiagnóstico realizado durante a fase de imunossupressão (pós-tratamento), experimento II. Conforme descrito anteriormente, em material e métodos, foram utilizadas três ninfas de três diferentes tipos de ninfas de triatomíneos por camundongo ( <i>Rhodnius prolixus</i> , <i>Triatoma dimidiata</i> , <i>Triatoma infestans</i> ). Cada sinal de (+) representa a quantidade de animais positivos para xenodiagnóstico indireto; (-) ausência de parasitos durante o xenodiagnóstico.....	104
<b>Tabela 8</b> - Comparação entre os valores de TGO dos animais do experimento II. Valores absolutos/animal, médias e desvio padrão dos grupos. (-): Óbito; (*): plasma insuficiente para análise; (#) ausência de animal; (ND) não determinado. ....	109
<b>Tabela 9</b> - Comparação entre os valores de TGP dos animais do experimento II. Valores absolutos/animal, médias e desvio padrão dos grupos. (-): Óbito; (*): plasma insuficiente para análise.....	109
<b>Tabela 10</b> – Métodos comuns para detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> em hospedeiros mamíferos, modelo experimental. <sup>β</sup> Devido à variabilidade na distribuição dos focos de parasitas ao longo do tempo e entre os locais dos tecidos. ....	134
<b>Tabela 11</b> – Resumo de todos os estudos in vivo realizados com NFOH. (-) não realizado; (ND) não determinado. ....	148

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1 - Síntese do NFOH.....</b>	<b>62</b>
---	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - (I) Berenice (criança) primeira paciente diagnosticada com a doença de Chagas (II) Jornal da Tarde, 7 de maio de 1979. Berenice, uma criança em 1909, foi o primeiro caso descrito da doença de Chagas. Foi ao óbito por insuficiência cardíaca, aos 82 anos. ....	24
<b>Figura 2</b> - Rota migratória a partir da América Latina e número estimado de indivíduos infectados em países não endêmicos. ....	25
<b>Figura 3</b> - <i>Triatoma infestans</i> . ....	26
<b>Figura 4</b> - Formas de <i>T. cruzi</i> . ....	27
<b>Figura 5</b> - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> . ....	28
<b>Figura 6</b> - Distribuição geográfica de TcI nas Américas. ....	30
<b>Figura 7</b> - Modelo de Hibridização que evidencia trocas genéticas durante a evolução de <i>T. cruzi</i> . As fusões entre duas células e a troca de material genético são indicadas pelas caixas ovais. As linhagens mitocondriais são evidenciadas pelas diferentes cores. ....	31
<b>Figura 8</b> - Distribuição das DTUs de <i>T. cruzi</i> no ciclo de transmissão doméstico e silvestre. ....	32
<b>Figura 9</b> - a. Sinal de Romaña (edema de pálpebras). b. Chagoma (edema no local da infecção). ....	33
<b>Figura 10</b> - Representação de coração de pacientes normais e com cardiomiopatia chagásica. ....	35
<b>Figura 11</b> - Análise de imagem por técnica de ressonância magnética do baço de ratos. (A) não infectados e (B) infectados cronicamente com <i>T. cruzi</i> . (C) ilustração da diferença no volume do baço de ambos os grupos. ....	36
<b>Figura 12</b> - Representação esquemática da organização do SNE em um tecido saudável. ....	37
<b>Figura 13</b> - Imagem por ressonância magnética (MRI) com sobreposição tridimensional do colón, rim e bexiga de ratos. (A) não infectados e (B) infectados cronicamente com <i>T. cruzi</i> . ....	38
<b>Figura 14</b> - Ciclo natural da doença de Chagas no homem. ....	39
<b>Figura 15</b> - Alvos terapêuticos da via da biossíntese de ergosterol. ....	40
<b>Figura 16</b> - Estrutura química da lovastatina. ....	41
<b>Figura 17</b> - Estrutura química do risedronato. ....	42

<b>Figura 18</b> - Estrutura química dos compostos E5700 e ER-119884.....	42
<b>Figura 19</b> - Estrutura química do posaconazol. ....	43
<b>Figura 20</b> - Redução de tripanotiona dissulfeto para ditiol tripanotiona pela enzima tripanotiona redutase.....	44
<b>Figura 21</b> - Estruturas químicas do nifurtimox e benznidazol. ....	46
<b>Figura 22</b> - Estrutura química dos compostos nitro-heterociclicos utilizados como antiprotozoários e antimicrobianos.....	47
<b>Figura 23</b> - Estrutura química do nitrofural (NF). ....	48
<b>Figura 24</b> - Estrutura química do hidroximetilnitrofural (NFOH).....	49
<b>Figura 25</b> - Efeito de 5 $\mu$ M NF, 10 $\mu$ M NF, 5 $\mu$ M NFOH e 10 $\mu$ M BZN) em porcentagem de tripomastigotas pós-infecção das células com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . Controle positivo não expresso: 100%. ....	49
<b>Figura 26</b> - Efeito de 5 $\mu$ M NF, 10 $\mu$ M NF, 5 $\mu$ M NFOH e 10 $\mu$ M BZN em porcentagem de amastigotas pós-infecção das células com formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> . Controle positivo não expresso: 100%. ....	50
<b>Figura 27</b> - Docking do NF (A) e NFOH (B), na enzima cruzaina presente no <i>T. cruzi</i> .....	52
<b>Figura 28</b> - Mapas dos potenciais eletrostáticos do NF e NFOH.....	52
<b>Figura 29</b> - Atividade mutagênica ( <i>S. typhimurium</i> cepa TA98) do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios com e sem ativação metabólica (S9). (*) óbito animal. ....	53
<b>Figura 30</b> - Atividade mutagênica ( <i>S. typhimurium</i> TA102) do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios com e sem ativação metabólica (S9).....	54
<b>Figura 31</b> - Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 50, 100, 250 e 500 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.....	55
<b>Figura 32</b> - Trabalhos publicados com o candidato antichagásico Hidroximetilnitrofural NFOH, em relação ao Nitrofural (NF) e o Benznidazol (BNZ). ....	59
<b>Figura 33</b> - Construção do parasito luminescente: CL-Brener luc (TcVI) bioluminescente. ....	65
<b>Figura 34</b> - Protocolo do experimento I. Tratamento durante a fase aguda da doença de Chagas e acompanhamento parasitêmico até a fase crônica indeterminada, utilizando duas diferentes linhagens de camundongos: Swiss e C57Bl6 (cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> ). ....	68

<b>Figura 35</b> - Protocolo prático do experimento <b>II</b> . Tratamento durante a fase crônica indeterminada da doença de Chagas, e acompanhamento parasitêmico até o dia 161 após infecção, utilizando linhagens de camundongos Bablb/C (cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> ). .....	70
<b>Figura 36</b> - Protocolo prático do experimento <b>III</b> . Tratamento durante a fase aguda (14 – 18 dpi) da doença de Chagas; círculos em rosa são a análises parasitêmicas por meio de imagens nos 11, 18, 24 e 31 dpi (cepa CL Brener bioluminescente de <i>T. cruzi</i> ); traços em vermelho são períodos de administração de ciclofosfamida, induzindo imunossupressão dos animais, nos 24 e 28 dpi. ....	72
<b>Figura 37</b> - Protocolo prático do experimento <b>IV</b> . Tratamento durante a fase crônica (125 – 129 dpi) da doença de Chagas; círculos em rosa são a análises parasitêmicas por meio de imagens nos 15, 125, 133, 140, 148 e 163 dpi (cepa CL Brener bioluminescente de <i>T. cruzi</i> ); traços em vermelho são períodos de administração de ciclofosfamida, induzindo imunossupressão dos animais, nos 140, 144 e 148 dpi.....	74
<b>Figura 38</b> - Procedimento padrão para experimentos de imagem in vivo.....	77
<b>Figure 39</b> – Representação esquemática dos cortes seriados realizados nos experimentos <b>I</b> e <b>II</b> . <b>(A)</b> : representação anatômica. <b>(B)</b> : órgão representativo (exemplo: coração). <b>(C)</b> : seção e cortes histopatológicos seriados (3 mm). <b>(D)</b> : cortes já inclusos em parafina no cassete. Todos os órgãos citados pelo autor receberam cortes histopatológicos transversais e seriados. ....	81
<b>Figure 40</b> - Representação esquemática do processamento realizado nos experimentos <b>III</b> e <b>IV</b> . <b>(A)</b> : representação anatômica. <b>(B)</b> : órgão representativo e cortes histopatológicos (exemplo: coração). <b>(C)</b> : cortes já inclusos em parafina no cassete. Todos os órgãos citados pelo autor receberam cortes histopatológicos sargitais medianos. ....	82
<b>Figura 41</b> - Curva de calibração para a enzima TGO (U/L). .....	85
<b>Figura 42</b> - Curva de calibração para a enzima TGP (U/L). ....	86
<b>Figura 43</b> - Média e desvio padrão dos níveis parasitêmicos de cada grupo observadas em camundongos Swiss inoculados com $1 \times 10^2$ formas da cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> – Experimento <b>I</b> . Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (20 dias). .....	88

<b>Figura 44</b> - Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Swiss infectados com $10^2$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia do <i>T. cruzi</i> (INT, IBZN e INFOH), e grupo não infectado (NI).....	90
<b>Figura 45</b> - Peso relativo dos órgãos dos camundongos Swiss (experimento I). ....	91
<b>Figura 46</b> - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos. INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Codificação histopatológica, crescente do branco ao azul escuro: 0-1,0 = leve (+); 1,1-2,0 = moderado (++); 2,1-3,0 = intenso (+++). (*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ); (**) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,005$ ). ....	93
<b>Figura 47</b> - Fotografia histopatológica representativa do coração (H&E, 400X), músculo esquelético (H&E, 400X), cólon (H&E, 400X) e fígado (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Seta amarela: presença de ninhos amastigotas; seta verde: infiltrados inflamatórios.....	94
<b>Figura 48</b> - Média e desvio padrão dos níveis parasitêmicos de cada grupo observadas em camundongos C57Bl6 inoculados com $1 \times 10^2$ formas da cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> – Experimento I. Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (20 dias). ....	95
<b>Figura 49</b> - Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos C57Bl6 infectados com $10^2$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia do <i>T. cruzi</i> (INT, IBZN e INFOH), e grupo não infectado (NI).....	97
<b>Figura 50</b> - Peso relativo dos órgãos dos camundongos C57Bl6 (experimento I)....	98
<b>Figura 51</b> - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos. INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Codificação histopatológica, crescente do branco ao azul escuro: 0-1,0 = leve (+); 1,1-2,0 = moderado (++); 2,1-3,0 = intenso (+++). (*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ); (**) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,005$ ). ...	100
<b>Figura 52</b> - Fotografia histopatológica representativa do coração (H&E, 400X), músculo esquelético (H&E, 400X), cólon (H&E, 400X) e fígado (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com	



hidroximetilnitrofural. Seta amarela: presença de ninhos amastigotas; seta verde: infiltrados inflamatórios.....	101
<b>Figura 53</b> - Média e desvio padrão dos níveis parasitêmicos de cada grupo observadas em camundongos Balb/c inoculados com $1 \times 10^2$ formas da cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> – Experimento II. Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (60 dias). Área em rosa representa período de imunossupressão (dexametasona 5 mg/kg/dia – 14 dias). .....	102
<b>Figura 54</b> - Experimento II. Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Balb/c infectados com $1 \times 10^2$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia do <i>T. cruzi</i> (INT, IBZN e INFOH), e grupo não infectado (NI). .....	105
<b>Figura 55</b> - Peso relativo dos órgãos dos camundongos Balb/c (experimento II)...	107
<b>Figura 56</b> - Resultados de biomarcadores hepáticos para os animais do experimento II. (*): Estatisticamente diferente do grupo NI. (a): $p < 0,05$ ; (b): $p \leq 0,005$ ; (c): $p \leq 0,0005$ . .....	108
<b>Figura 57</b> - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos do experimento II. INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofural. Codificação histopatológica, crescente do branco ao azul escuro: 0-1,0 = leve (+); 1,1-2,0 = moderado (++); 2,1-3,0 = intenso (+++). (*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ); (**) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,005$ ). ...	112
<b>Figura 58</b> - Fotografia histopatológica representativa do coração (H&E, 200X) e músculo esquelético (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofural. Seta verde: presença de ninhos amastigotas; seta preta: infiltrados inflamatórios. ....	113
<b>Figura 59</b> - Fotografia histopatológica representativa do cólon (H&E, 50X e 400X) e fígado (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofural. Seta verde: presença de ninhos amastigotas; seta preta: infiltrados inflamatórios.....	114
<b>Figura 60</b> – Fotografia histopatológica representativa do baço (H&E, 50X) e rins (H&E, 100X) e cérebro (H&E, 50X e 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofural. ....	115

<b>Figura 61</b> - Experimento III. Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Balb/c infectados com $10^3$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL Brener biolumineste do <i>T. cruzi</i> (INT, IBZN e INFOH). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Linhas pontilhadas representam as doses de imunossupressão (ciclofosfamida 200 mg/kg). .....	116
<b>Figura 62</b> - Parasitemia por imagens de bioluminescência de cada grupo foi observada nos dias executado nos dias 11, 18, 24 e 31dpi (dias pós infecção) em camundongos Balb/c inoculados com $1 \times 10^3$ formas da cepa CL Brener Bioluminescente de <i>T. cruzi</i> – Experimento III. Linha vermelha representa o período de imunossupressão (ciclofosfamida 200) realizados nos dias 24 e 28dpi. Período de tratamento: 14-18dpi. ....	117
<b>Figure 63</b> - Parasitemia do experimento III, expressados em valores de fótons por segundo (p/s). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Seta azul (linha pontilhada) representa doses de imunossupressão (ciclofosfamida 200mg/kg).....	118
<b>Figure 64</b> - Análise ex vivo por imagem dos camundongos Balb/c (experimento III). .....	119
<b>Figura 65</b> - Resultados obtidos da análise histopatológica do coração dos animais do experimento III em relação ao número de infiltrados inflamatórios (A e B, Hematoxilina e Eosina) e a quantidade total de colágeno (C e D, picosiriusred); Correlação de Pearson (E) entre ambas as medidas. (*): estatisticamente diferente do grupo NI. (**) estatisticamente diferente do grupo INT. (***) estatisticamente diferente do grupo IBZN. ....	121
<b>Figura 66</b> - Resultados obtidos da análise histopatológica do fígado dos animais do experimento III em relação ao número de infiltrados inflamatórios (A e B, Hematoxilina e Eosina) e a quantidade total de colágeno (C e D, picosiriusred); Correlação de Pearson (E) entre ambas as medidas. (*): estatisticamente diferente do grupo NI. (**) estatisticamente diferente do grupo IBZN. ....	123
<b>Figura 67</b> - Experimento IV. Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Balb/c infectados com $10^3$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL Brener biolumineste do <i>T. cruzi</i> (INT, IBZN e INFOH). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Linhas pontilhadas representam as doses de imunossupressão (ciclofosfamida 200 mg/kg). .....	124

<b>Figura 68</b> - Parasitemia por imagens de bioluminescência de cada grupo foram observadas nos dias 15, 125, 133, 140, 148 e 163 dpi (dias pós infecção) em camundongos Balb/c inoculados com $1 \times 10^3$ formas da cepa CL Brener luc bioluminescente de <i>T. cruzi</i> – Experimento <b>IV</b> . Linha vermelha representa o período de imunossupressão (ciclofosfamida 200) realizados nos dias 140, 144 e 148dpi. Período de tratamento: 125-129dpi.....	126
<b>Figura 69</b> - Parasitemia do experimento <b>IV</b> , expressados em valores de fótons por segundo (p/s). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Seta azul (linha pontilhada) representa as doses de imunossupressão (ciclofosfamida 200 mg/kg).....	127
<b>Figura 70</b> - Análise ex vivo por imagem dos camundongos Balb/c (experimento <b>IV</b> ). .....	128
<b>Figura 71</b> - Resultados obtidos da análise histopatológica do coração dos animais do experimento <b>IV</b> em relação ao número de infiltrados inflamatórios ( <b>A</b> e <b>B</b> , Hematoxilina e Eosina) e a quantidade total de colágeno ( <b>C</b> e <b>D</b> , picrosiriusred); Correlação de Pearson ( <b>E</b> ) entre ambas as medidas. (*): estatisticamente diferente do grupo <b>NI</b> . (**): estatisticamente diferente do grupo <b>IBZN</b> . .....	130
<b>Figura 72</b> - Resultados obtidos da análise histopatológica do fígado dos animais do experimento <b>IV</b> em relação ao número de infiltrados inflamatórios ( <b>A</b> e <b>B</b> , hematoxilina e eosina) e a quantidade total de colágeno ( <b>C</b> e <b>D</b> , picrosiriusred); Correlação de Pearson ( <b>E</b> ) entre ambas as medidas. (*): estatisticamente diferente do grupo <b>NI</b> . (**): estatisticamente diferente do grupo <b>IBZN</b> . .....	132
<b>Figura 73</b> – Resumo da doença de Chagas em Humanos com sintomas e diagnósticos para ambos estágios (agudo e crônico). .....	133
<b>Figura 74</b> - Mecanismo de bioluminescência de <i>T. cruzi</i> , desenvolvimento para descoberta de novos fármacos e melhor compreensão da doença de Chagas. ( <b>A</b> ) <i>T. cruzi</i> , luciferase (enzima, círculo verde), oxigênio (círculo azul), D-luciferina (pentágonos amarelos); ( <b>B</b> ) D-luciferina na presença de oxigênio reage com a luciferase (enzima); ( <b>C</b> ) reação produz fótons de luz; ( <b>D</b> ) D-luciferina quando oxidada totalmente forma oxiluciferina; ( <b>E</b> ) reação química catalisada pela luciferase. ....	137
<b>Figura 75</b> – Resumo dos principais resultados do tratamento com NFOH observados nos experimentos <b>I-IV</b> . .....	141

<b>Figura 76</b> - Achados histopatológicos em diferentes camundongos (Swiss e C57Bl6) com mesma cepa (Bolivia) de <i>T. cruzi</i> . Grupos infectados não tratados (INT), experimento I.....	143
<b>Figura 77</b> - Achados histopatológicos em diferentes camundongos com mesma cepa de <i>T. cruzi</i> (cep Bolivia). Grupos infectados não tratados (INT), experimento II e IV. ....	143
<b>Figure 78</b> - Screening e "Washout essay" <i>in vitro</i> do composto NFOH em cepas fluorescentes de <i>T. cruzi</i> . ....	146

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
2. OBJETIVO.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	60
4.RESULTADOS	86
5. DISCUSSÃO .....	132
6. CONCLUSÕES .....	148
7. REFERÊNCIAS.....	150
8. ANEXOS .....	175

## 1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) configuram desproporcional problema publico-sanitário e enorme ônus econômico para os países endêmicos, e atualmente estão se expandindo para países não endêmicos devido às correntes migratórias. Essas doenças endêmicas em cerca de 150 países, atingem aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas e são responsáveis por milhares de mortes anuais (FEASEY *et al.*, 2010; COHEN, *et al.*, 2014). Entretanto, as DTN não costumam despertar a atenção das empresas farmacêuticas devido aos baixos retornos financeiros, considerando a baixa renda dos países e pessoas afetadas. Portanto, as colaborações, bem como o interesse da indústria farmacêutica, são extremamente importantes para cobrir essa lacuna, juntamente com universidades e/ou centros de pesquisas, formando, assim, parcerias público-privadas, sem fins lucrativos, voltadas, principalmente, para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das DTN (SCARIM *et al.*, 2018; SCARIM; CHUNG, 2018).

Diante da necessidade de novos tratamentos, mais ativos e menos tóxicos ao paciente, observou-se, nos últimos anos, aumento dos trabalhos publicados e conseqüentemente uma expansão no emprego de capitais públicos e/ou privados no combate das DTN (WHO, 2015; COHEN, *et al.*, 2014; FEASEY *et al.*, 2010). Nesse contexto, a principal “fonte de energia” para chegarmos a um fármaco ideal para uma enfermidade dentre as DTNs envolve o empenho e a dedicação constante de pesquisadores na identificação de compostos bioativos.

De acordo com os dados publicados da “European Medicines Agency (EMA) e U.S. Food and Drug Administration (FDA)”, entre 2000 e 2011, 850 novos produtos farmacêuticos com atividade terapêutica foram registrados como candidatos a fármacos, produtos com novas indicações, novas formulações e vacinas, e somente 4%, 29 fármacos e oito vacinas, foram destinados às DTN. Além disso, das 336 novas entidades químicas aprovadas, somente 4 (1%) foram aprovadas para doenças como malária (3) e doenças diarreicas (1), e nenhum fármaco para doenças tropicais negligenciadas. De fato, os dados demonstraram que 148.445 ensaios clínicos foram realizados entre 2000 e 2011 e apenas 2.016 envolveram doenças negligenciadas (1%) (PEDRIQUE *et al.*, 2013).

Trabalho publicado por Cohen *et al.* (2014) complementa e sobrepõe o trabalho anterior, pois foram avaliados os compostos aprovados de 2009 a 2013, mostrando 20 novos medicamentos, dos quais 15 para doenças como HIV/AIDS, tuberculose e malária, e apenas cinco novos medicamentos foram lançados para as demais doenças negligenciadas nesse período, o que as tornam extremamente negligenciadas.

Os dados anteriormente relatados demonstram piora nos dados publicados em 2002 por membros do “Drugs for Neglected Diseases initiative” (DNDi), no qual observou-se que de 1.393 novos fármacos aprovados, entre 1975 e 1999, apenas 21 eram voltados às doenças negligenciadas. De fato, um documento do MSF (Médicos Sem Fronteiras) e DNDi indicam que o número de novos fármacos desenvolvidos para as doenças negligenciadas continua o mesmo há mais de duas décadas (WILLYARD, 2013; DNDi,2002).

## **1.1. Revisão Bibliográfica**

### **1.1.1. Doença de Chagas**

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das principais patologias do continente americano, e foi descrita pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, em 1909, que efetuou as primeiras investigações sobre tal parasitose, durante expedição à pequena cidade de Lassance – MG. O cientista descreveu o agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*) e toda cadeia epidemiológica dessa zoonose, ou seja, o vetor, reservatórios e afecção humana (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010; CHAGAS, 1909). O primeiro caso descrito por Carlos Chagas foi o de uma criança, em 14 de fevereiro de 1909. Ao observar seu sangue sob lâmina/lamínula deparou-se com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 1).



**Figura 1** - (I) Berenice (criança) primeira paciente diagnosticada com a doença de Chagas (II) Jornal da Tarde, 7 de maio de 1979. Berenice, uma criança em 1909, foi o primeiro caso descrito da doença de Chagas. Foi ao óbito por insuficiência cardíaca, aos 82 anos.

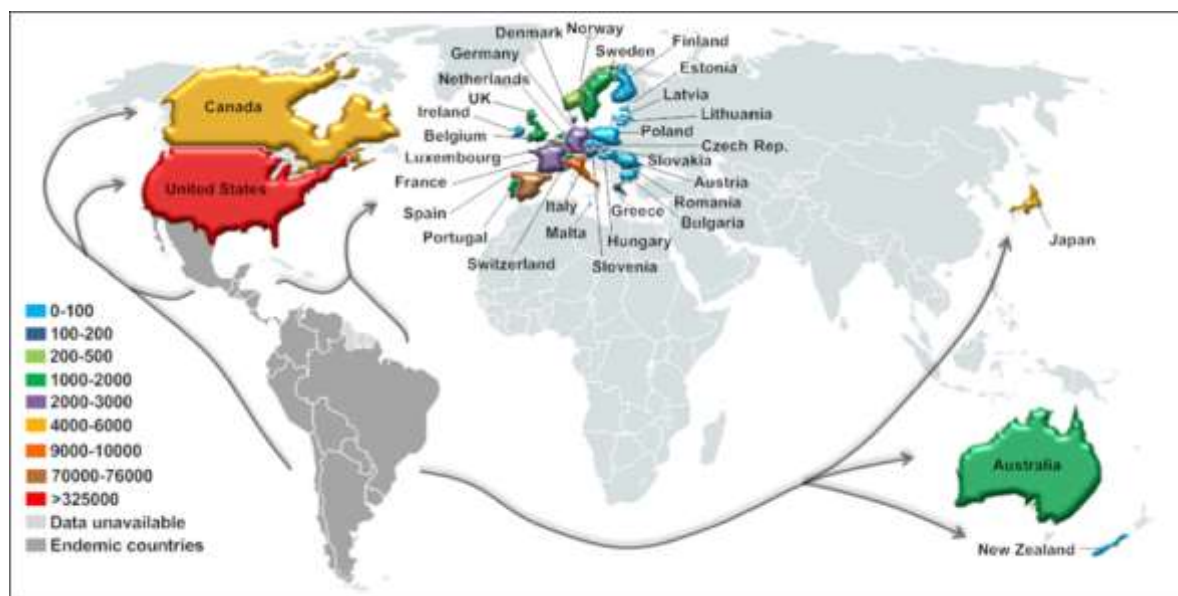
Fonte: extraído e adaptado de LIDANE *et al.*, 2019.

Toda sua competência e dedicação aos estudos colaboraram para seu reconhecimento tanto em nível nacional quanto internacional. Seu estudo (mais conceituado) levou seu nome e ficou conhecido como doença de Chagas. Isso em um período em que o Brasil, assim como outros países, convivia com graves problemas de saúde relacionados às doenças transmissíveis, transmitindo com impacto na economia social e política do país. Também não havia recursos tecnológicos para caracterização da doença (GOLDBAUM; BARRETO, 2008).

De acordo com dados recém-publicados, existem em torno seis milhões de pessoas infectadas pela doença de Chagas no mundo, principalmente entre o México e a Argentina, onde a parasitose é endêmica e estima-se que 75 a 90 milhões de pessoas estejam expostas à infecção. No Brasil, os casos crônicos da doença de Chagas são predominantes, com um número aproximado de três milhões de indivíduos contaminados pelo parasito (DNDi, 2019; WHO, 2015; BRASIL, 2015; COURA; DIAS, 2010).

Contudo, devido às correntes migratórias e ao avanço da globalização, houve um intenso movimento migratório de pessoas provenientes de áreas endêmicas para as demais regiões do mundo, onde a doença não é endêmica, como países da América do Norte, Europa, Ásia e até da Oceania (Figura 2) (COURA; VIÑAS, 2010).





**Figura 2** - Rota migratória a partir da América Latina e número estimado de indivíduos infectados em países não endêmicos.

Fonte: extraído e adaptado de LIDANE *et al.* 2019.

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma zoonose endêmica, que não apresenta variações cíclicas ou sazonais de importância epidemiológica, apontada como uma grave doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi*. Essa doença apresenta como vetores os triatomíneos (LIDANI *et al.*, 2019; URBINA, 2002).

### 1.1.2. Vias de Transmissão

A principal via de transmissão é a vetorial, por meio do contato direto de fezes contaminadas do inseto, que é hematófago, com orifício da picada ou regiões de mucosa (BARRETT *et al.*, 2003). Diversas espécies são hospedeiros invertebrados do parasito, as mais importantes são *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* (Figura 3), sendo a última a mais encontrada no sul da América do Sul. As outras duas são prevalentes na região norte da América do Sul e na América Central. Os triatomíneos pertencem à família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2002; SHERLOCK, *et al.*, 1999).



**Figura 3 - *Triatoma infestans*.**

Fonte: extraído de

<http://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2004/Trypanosomiasis/vector.htm> (acesso em 03/02/2020)

Existem outras formas de infecção por *T. cruzi*, além da forma vetorial, como transmissão congênita, ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e acidente laboratorial (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).

Sobre a transmissão congênita estudos apontam que cerca de 5% dos bebês nascem infectados pelas mães portadoras da doença na fase crônica. Quanto maior o número de formas tripomastigotas circulantes na mãe, maior pode ser o risco de infecção (WENDEL, 2010; BERN, 2009; BRUTUS *et al.*, 2010; HOWARD *et al.*, 2013). Assim como a transmissão congênita, a transmissão por transfusão sanguínea também exige triagem para prevenir futuros casos da doença. (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010; WENDEL, 2010).

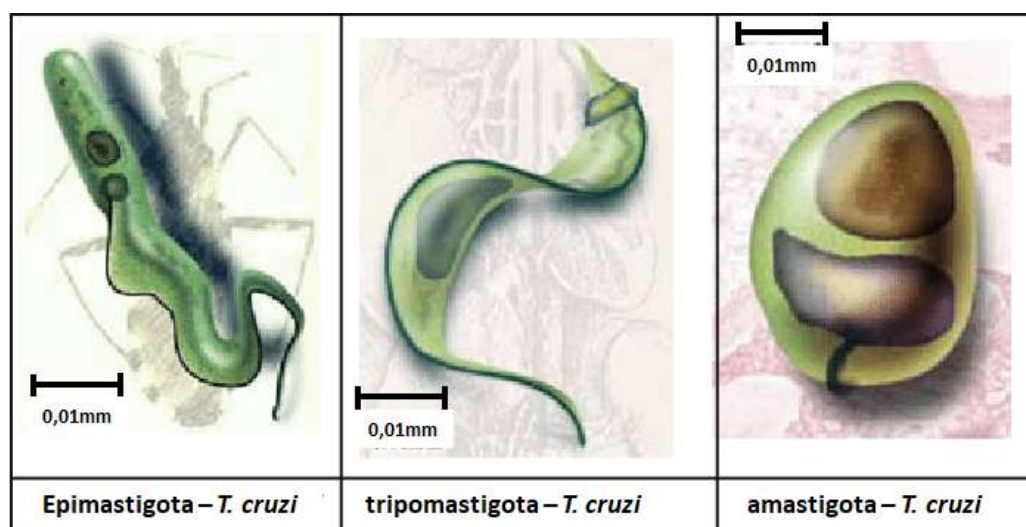
A infecção por meio de transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea ocorre quando o órgão em questão está infectado com formas amastigotas de *T. cruzi*, uma vez que essas se transformam em tripomastigotas, ficando livres para infectar outras células (VILLALBA *et al.*, 1992; KIRCHHOFF, 2011).

A infecção oral acontece por meio do consumo de alimentos contendo fezes ou o próprio inseto (moído) contaminado, como o açaí e a cana de açúcar. Foi relatada infecção pela ingestão de carne crua e demonstrada experimental e clinicamente. Essas modalidades de transmissão demonstram grande importância nos casos de morbidade e mortalidade na infecção aguda da doença associada a elevadas concentrações de parasito. Em 2005, houve um surto de contaminação oral na região Sul do Brasil, despertando atenção internacional, uma vez que afetou

um grupo de turistas e apresentou alta morbidade e mortalidade com 45 casos suspeitos, sendo 31 casos confirmados e cinco mortes. No entanto essa forma de propagação da doença é mais frequente e evidente na região da Amazônia (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010; BRASIL, 2015; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2006).

### 1.1.3. Ciclo Biológico do parasito

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com diversas etapas de multiplicação no vetor e no hospedeiro vertebrado. No vetor, o parasito se encontra nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Já no hospedeiro vertebrado, o parasito encontra-se na sua forma infectante, tripomastigota, e na sua forma intracelular, amastigota (Figura 4). Durante a fase aguda, qualquer célula nucleada pode ser infectada (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).



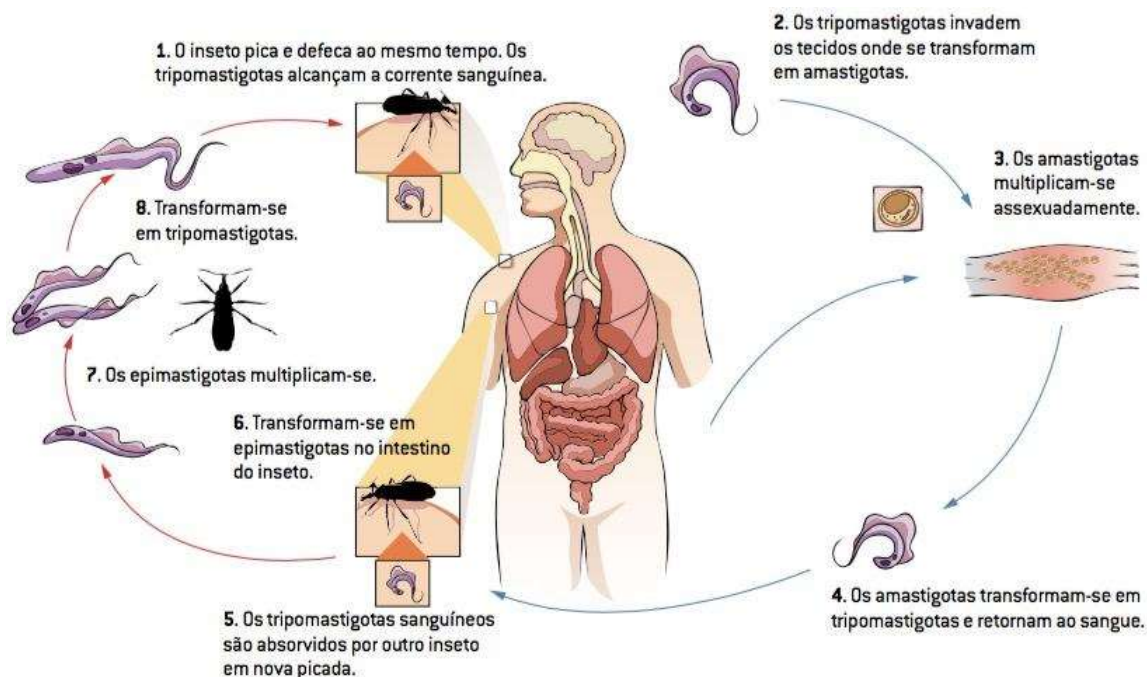
**Figura 4** - Formas de *T. cruzi*.

Fonte: extraído e adaptado de MUÑOZ-SARAVIA *et al.*, 2010.

O ciclo biológico tem início durante o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado sadio em hospedeiro vertebrado infectado. O vetor acaba por ingerir a forma tripomastigota do parasito. Ao chegar ao estômago do inseto as formas tripomastigotas transformam-se em esferomastigotas e epimastigotas, as quais migram para o intestino. Dessa maneira, as formas epimastigotas sofrem divisão binária no local e, ao migrarem para o reto, transformam-se novamente na forma

infectante, tripomastigotas metacíclicos. Essas são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado saudável (ESCH; PETERSEN, 2013).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo inicia-se quando as formas tripomastigostas eliminadas pelo triatomíneo são inoculadas no hospedeiro vertebrado. Essa forma do parasito tem a capacidade de penetrar em qualquer célula nucleada e desenvolver-se. Após aderir à membrana da célula, o parasito é fagocitado e começa a se transformar na forma amastigota e, simultaneamente, destrói a membrana do fagócito. Já no citoplasma, a forma amastigota inicia divisão celular binária e continua nesse processo por vários dias no interior da célula. Após, aproximadamente, cinco dias, as formas amastigotas iniciam o processo de transformação na forma tripomastigota. Nesse estágio, o parasito estimula movimentos com seu flagelo de maneira intensa, levando ao rompimento da célula, liberando os parasitos no meio extracelular. Tanto as formas amastigotas quanto as formas em transição e formas tripomastigotas têm a capacidade de infectar outros tipos celulares ou atingir a corrente sanguínea e distribuir-se por todo o organismo (SOUZA, 1999). O ciclo evolutivo da doença de Chagas, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado esta representado na Figura 5.

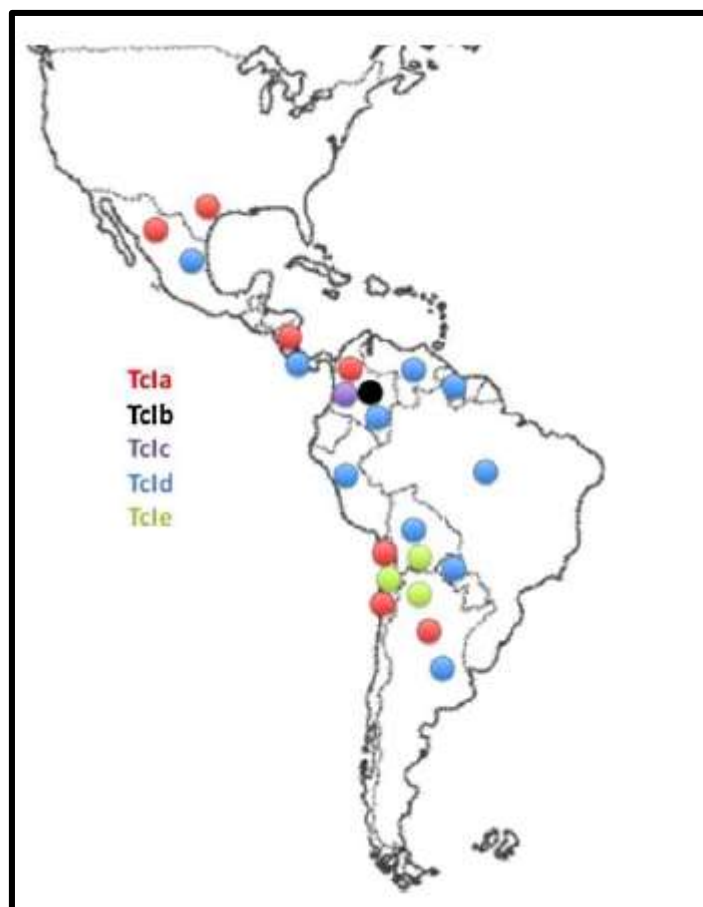


**Figura 5** - Ciclo de vida do *T. cruzi*.  
Fonte: extraído e modificado de CDC, 2009.

#### 1.1.4. Variabilidade intraespecífica de *T. cruzi*

Os primeiros estudos que demonstraram a diversidade genética de *T. cruzi* foram realizados por Miles *et al.*, na década de 1970. Esses autores analisaram o polimorfismo dos perfis eletroforéticos de seis enzimas e sugeriram uma classificação em três grupos distintos, que foram denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES *et al.*, 1977; 1978; 1980). Estudos epidemiológicos mostraram que Z1 e Z3 estão associados às cepas que circulam no ciclo silvestre e Z2 às que circulam no ciclo de transmissão doméstico, sugerindo associação entre hospedeiro e vetor (MILES *et al.*, 1978; 1980). Técnicas moleculares complementam-se com o objetivo de caracterizar cepas de *T. cruzi*. Souto *et al.* (1996) observaram que a amplificação do gene do mini-éxon e do gene 24 S $\alpha$  rDNA produzia a divisão das cepas em duas linhagens, nas quais fragmentos de DNA amplificados apresentavam de 125-300 pb (linhagem 1) e 110-350 pb (linhagem 2). Em 1999, adotou-se a divisão de *T. cruzi* em duas linhagens principais, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) (ANONYMOUS, 1999). Posteriormente, BRISSE *et al.* (2000) subdividiram o grupo TcII em cinco subgrupos, denominados TcIIa-TcIIe. Zingales *et al.* (2009) propuseram uma nova classificação de *T. cruzi* com o intuito de padronizar a nomenclatura reclassificando os grupos em seis unidades taxonômicas independentes - DTUs (TcI-TcVI).

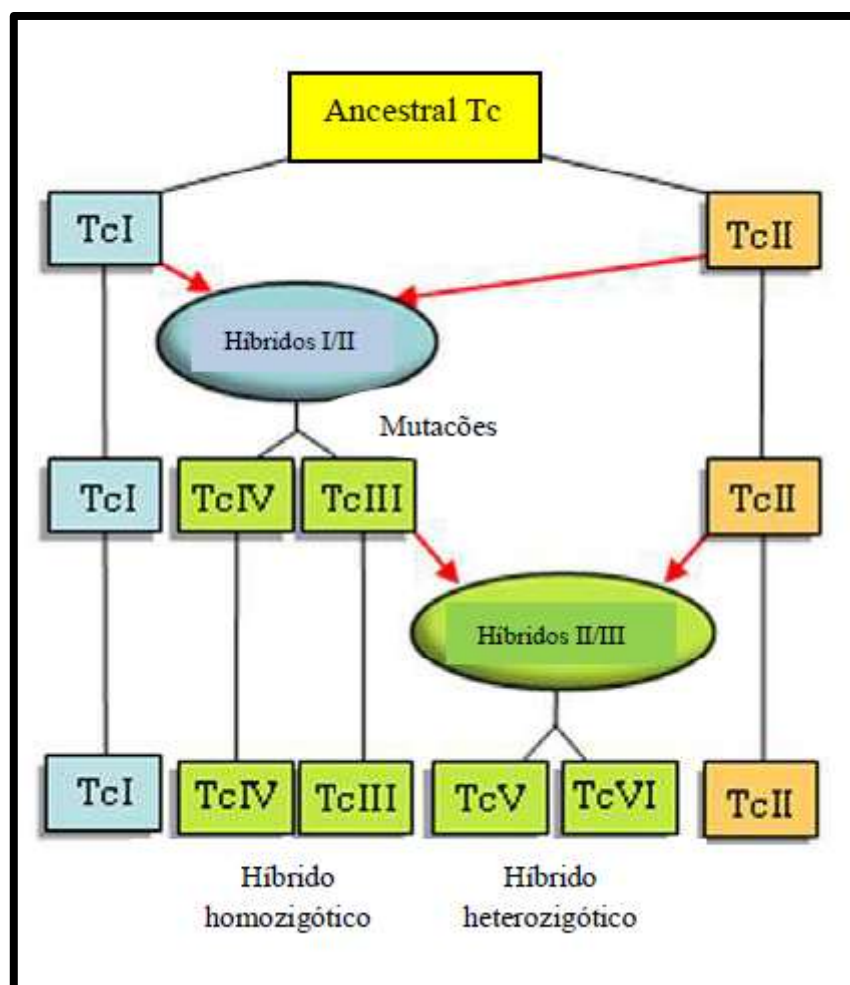
Entre as DTUs (Discrete Typing Units), o grupo TcI é o mais abundante e amplamente disperso (Figura 6), sendo foco de recentes tentativas de caracterização genética em sub-DTUs (GUHL; RAMÍREZ, 2011; HERRERA *et al.*, 2007; LLEWELLYN *et al.*, 2009; OCANA-MAYORGA *et al.*, 2011; RAMÍREZ *et al.*, 2011). A capacidade de isolar múltiplos clones de *T. cruzi* oriundos de hospedeiros individuais explica a existência de padrões de superinfecção e infrapopulação dentro de TcI (LLEWELLYN *et al.*, 2011).



**Figura 6** - Distribuição geográfica de TcI nas Américas.

Fonte: extraído de GUHL e RAMÍREZ (2012).

De acordo com a nova classificação (DTUs), os grupos TcI e TcII são os mais divergentes em termos moleculares e estimativas apontam que seu ancestral comum mais recente está entre 3 e 10 milhões de anos atrás. Estudos baseados na diversidade de nucleotídeos mostram que a relação filogenética dos grupos TcIII e TcIV pode ser interpretada como evento de hibridização entre os grupos TcI e TcII. Pesquisadores sugerem que TcIII e TcIV representam um único grupo ancestral e que compartilham características distintas em TcI e TcII. Essas hipóteses não são mutuamente exclusivas e como tal, TcIII e TcIV não são facilmente distinguidos. Por outro lado, não há consenso na literatura sobre a origem evolutiva de outros dois grupos, TcV e TcVI, sendo interpretados como híbridos que se originariam de TcIII e TcII, de acordo com a Figura 7 (ZINGALES *et al.*, 2012).



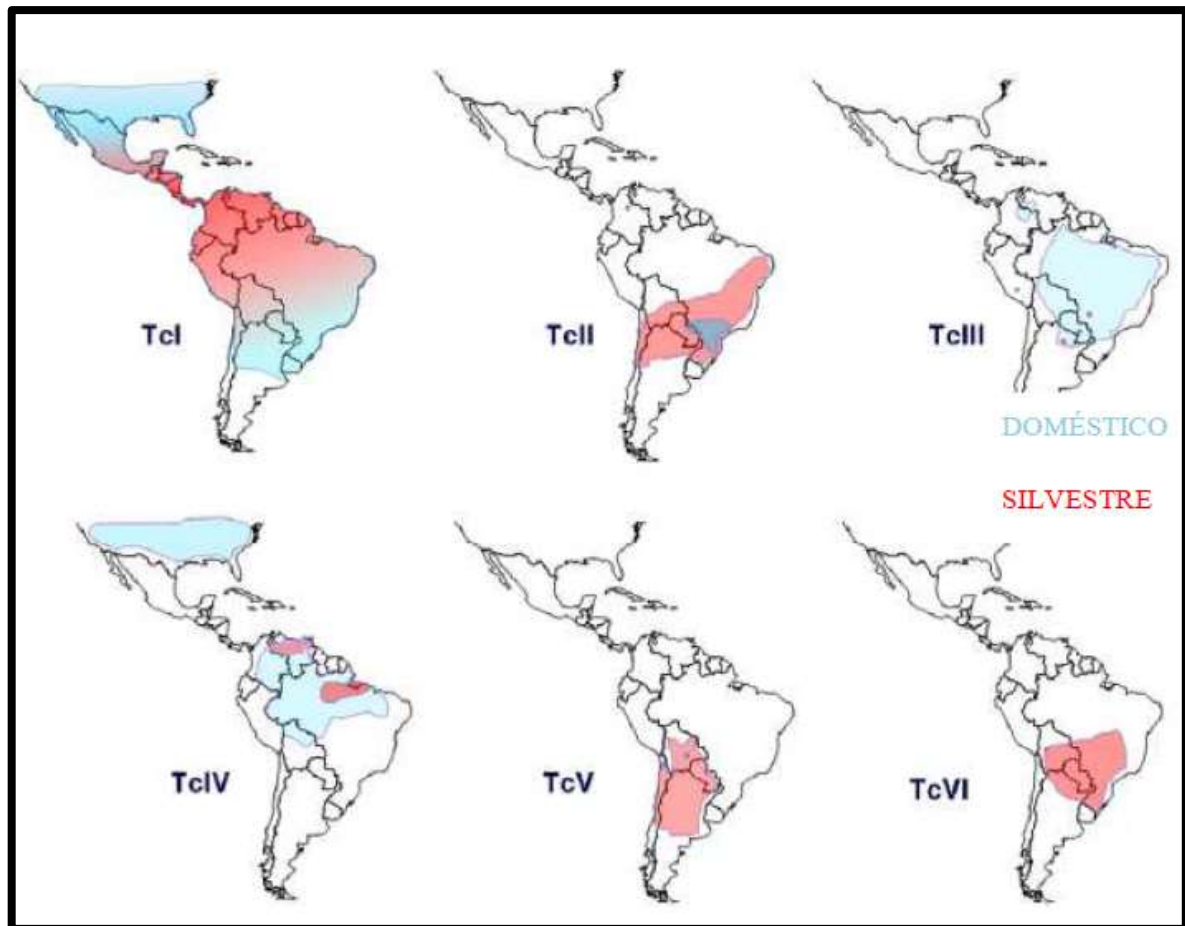
**Figura 7** - Modelo de Hibridização que evidencia trocas genéticas durante a evolução de *T. cruzi*. As fusões entre duas células e a troca de material genético são indicadas pelas caixas ovais. As linhagens mitocondriais são evidenciadas pelas diferentes cores.

Fonte: extraído e modificado de ZINGALES *et al.* (2012).

A ocorrência do grupo TcIII no ciclo doméstico implica a responsabilidade de agente da doença de Chagas humana, não excluindo a possibilidade de que esteja envolvido no ciclo silvestre e doméstico, tornando-se importante o estudo desse grupo (LLEWELLYN *et al.*, 2009). Justifica-se da mesma forma o estudo de TcI, principalmente em relação à dinâmica de infecção de *T. cruzi* no ciclo silvestre, uma vez que a literatura relata a importância ecológica e evolutiva desse grupo (ZUMARYA-ESTRADA *et al.*, 2012).

A caracterização biológica e molecular de cepas de *T. cruzi* auxilia no entendimento das interações parasito-hospedeiro e sua história evolutiva, como o trabalho de Zingales e colaboradores (2012), que discutiram associações entre vetor, ecótopo, hospedeiro e as seis DTUs. Os autores destacaram a importância em

correlacionar os grupos de *T. cruzi* e a ecoepidemiologia da doença de Chagas (Figura 8), assim como abordaram a complexidade molecular e biológica de cepas do parasito.



**Figura 8** - Distribuição das DTUs de *T. cruzi* no ciclo de transmissão doméstico e silvestre.

Fonte: adaptado de ZINGALES *et al.* (2012).

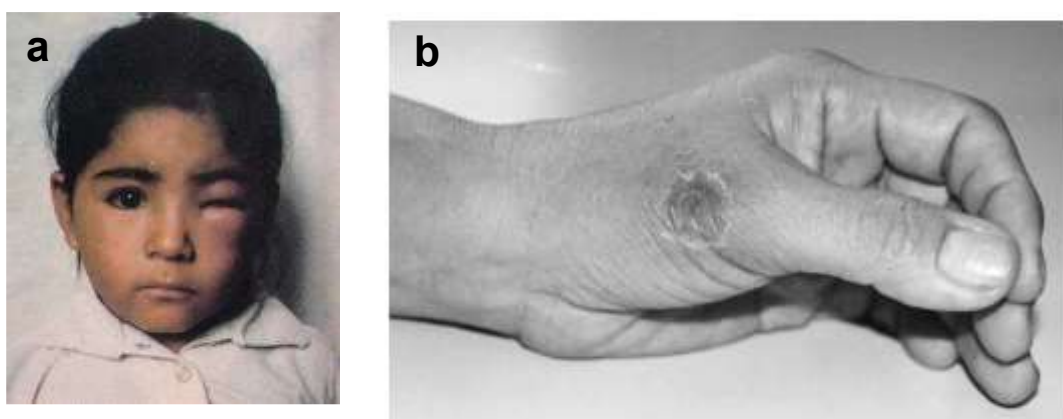
Portanto, a distribuição das DTUs pode ser definida por parâmetros como a ecologia, vetor, hospedeiro, preferência geográfica e associação com a doença. Ensaio *“in vitro”* e *“in vivo”* revelam variação fenotípica entre cepas de *T. cruzi* em termos fisiológicos, bioquímicos e de infectividade, correlação existente entre a genética dos grupos e seu potencial patogênico (ZINGALES *et al.*, 2012).



### 1.1.5. Patogênese e manifestações clínicas

De um modo geral, a doença de Chagas pode ser dividida em duas fases distintas – aguda e crônica (indeterminada ou determinada). O quadro clínico da fase aguda é determinado pelo número de parasitas presentes na corrente sanguínea, que podem infectar uma vasta gama de tecidos, comprovada pela demonstração de métodos diretos de exame. Essa fase é relativamente curta em humanos, aproximadamente de dois meses, podendo ser assintomática ou sintomática, quando há presença de sintomas (febre prolongada, mal-estar, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, miocardite, eletrocardiograma alterado e edema subcutâneo localizado ou generalizado) e está diretamente relacionada à parasitemia no indivíduo infectado (DIAS; COURA, 1997; ANDRADE, 2000).

No caso da infecção por via vetorial, o paciente pode apresentar sinais aparentes no local de entrada do parasito, infecção que quando ocorre na pele é conhecida como chagoma (geralmente permanece por duas semanas ou mais), e quando a infecção ocorre nas membranas oculares, denomina-se sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral com adenite satélite pré-auricular) (Figura 9). A fase aguda pode acarretar manifestações cardíacas, como uma miocardite aguda difusa, a qual pode levar ao óbito. Aproximadamente 90% dos casos sintomáticos (fase aguda) se solucionam de maneira natural. (COURA, 2007; DIAS *et al.*, 2009; RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010; RASSI *et al.*, 2012).



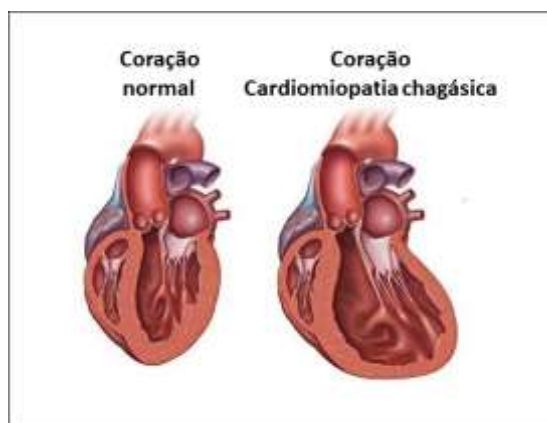
**Figura 9 - a.** Sinal de Romaña (edema de pálpebras). **b.** Chagoma (edema no local da infecção).

Fonte: extraídos e adaptados de [http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao\\_em\\_saude/CICT/Doenca\\_de\\_Chagas.htm](http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Doenca_de_Chagas.htm) (acesso em 03/02/2020) e KINOSHITA-YANAGA *et al.*, (2009), respectivamente.

Logo o quadro tende a evoluir para uma fase crônica indeterminada (período de latência), caracterizada pela ausência ou baixa parasitemia, responsável por aproximadamente 50-70% dos doentes. Em um “terceiro” estágio da doença (20-30%), fase crônica determinada, o indivíduo parasitado pode apresentar sintomatologia que envolve cardiopatias, megacólon ou megaesôfago (Figura 10) (FUENTES *et al.*, 2012; HABERLAND *et al.*, 2013).

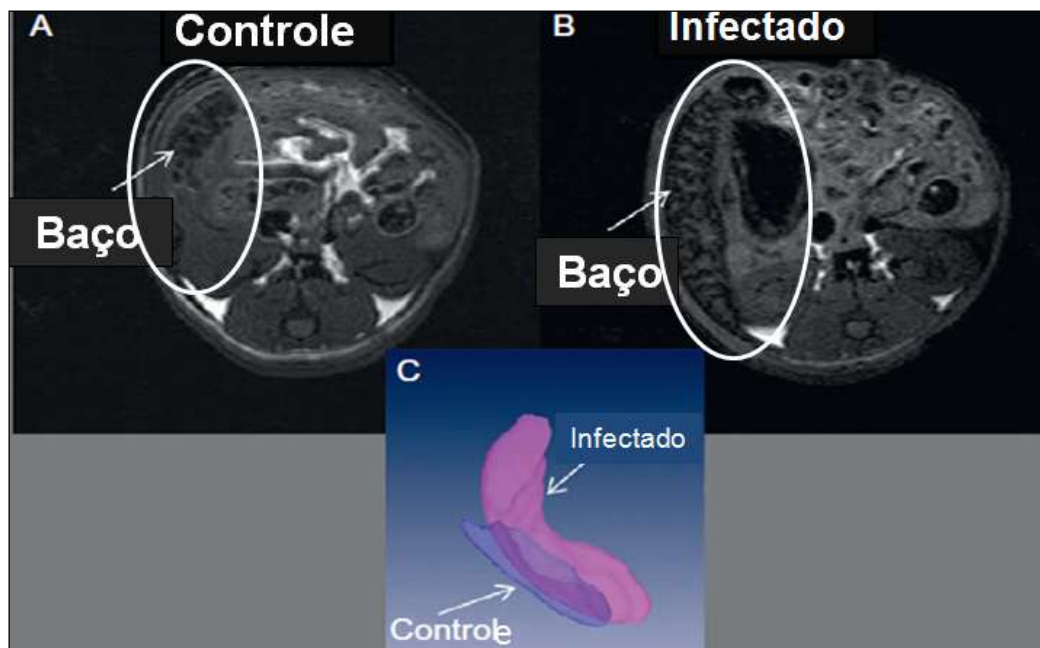
O acometimento cardíaco de tal patógeno pode ser explicado por duas hipóteses: a primeira seria devido a lesões nos tecidos cardíacos decorrentes ao processo imunológico, devido à presença de parasitos intracelulares. Já a segunda, em virtude do próprio parasitismo nas células cardíacas, que causa danos teciduais (BERN *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2009).

A cardiopatia chagásica crônica é definida como miocardiopatia inflamatória, evolutiva, recoberta por redes de fibrina, que destróem progressivamente o miocárdio e comprometem o sistema de formação e de condução do estímulo cardíaco. Os principais sintomas são: arritmia, dilatação das paredes do órgão, ocasionando insuficiência cardíaca e tromboembolismo (ANDRADE; ANDRADE, 1998; PRATA, 2001; BERN *et al.*, 2007). O coração infectado pode se apresentar com tamanho e peso (volume) normal ou gradualmente aumentado (DIAS; MACEDO, 2005; JELICKS; TANOWISZ, 2011). A principal razão de morte em indivíduos chagásicos cardiopáticos é morte súbita, cerca de 66%, seguido de insuficiência cardíaca e tromboembolismo (RASSI JR; RASSI, S.; RASSI, A., 2001; RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2009). A Figura 10 representa o coração normal e o do paciente chagásico (cardiomiopatia).



**Figura 10** - Representação de coração de pacientes normais e com cardiomiopatia chagásica.  
Fonte: autor.

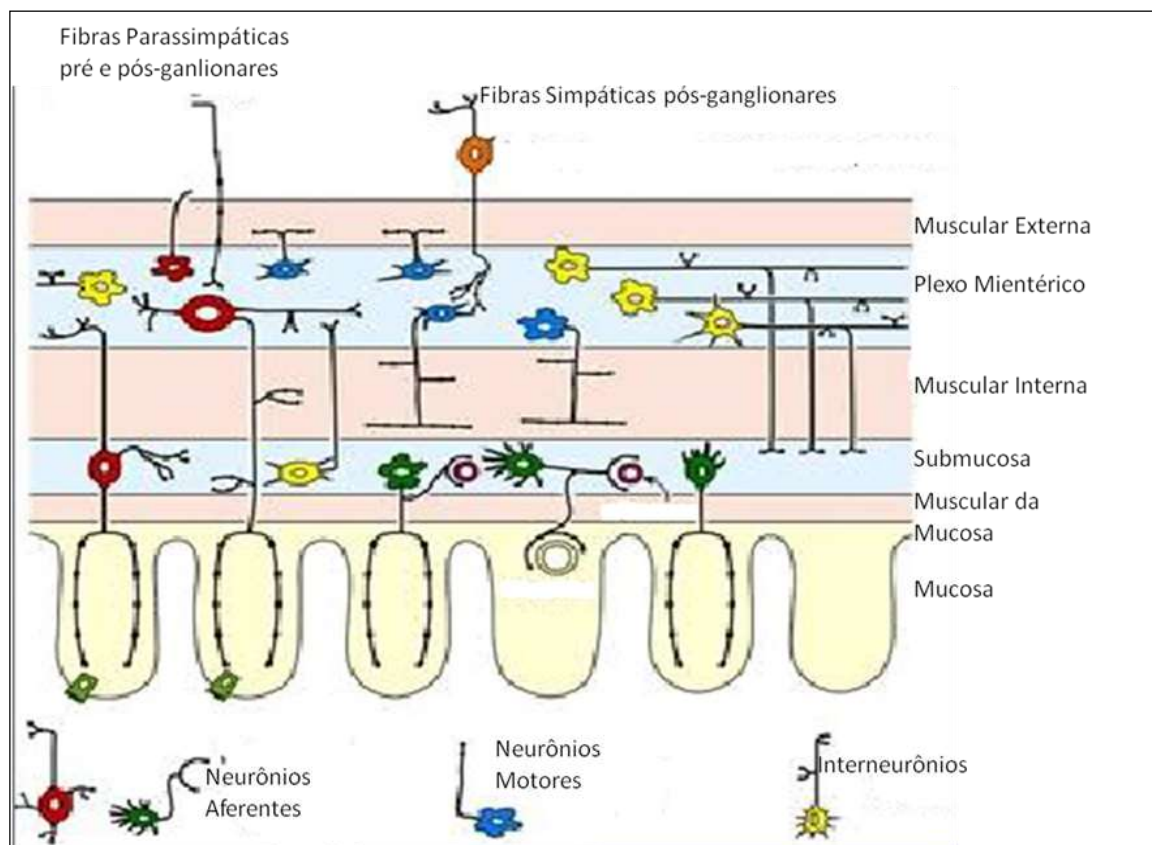
As alterações hemodinâmicas decorrentes de insuficiência cardíaca congestiva em pacientes chagásicos podem, por consequência, induzir a esplenomegalia congestiva, caracterizada por hiperplasia das células e desorganização dos folículos linfáticos do baço assim como a diminuição da densidade dos mesmos, aumento da polpa vermelha e diminuição da polpa branca, favorecendo uma provável associação do comprometimento cardíaco com o volume e situação morfológica do baço (Figura 11) (PEREIRA *et al.*, 2002; JELICKS; TANOWISZ, 2011).



**Figura 11** - Análise de imagem por técnica de ressonância magnética do baço de ratos. (A) não infectados e (B) infectados cronicamente com *T. cruzi*. (C) ilustração da diferença no volume do baço de ambos os grupos.

Fonte: extraído de JELICKS, TANOWISZ, 2011.

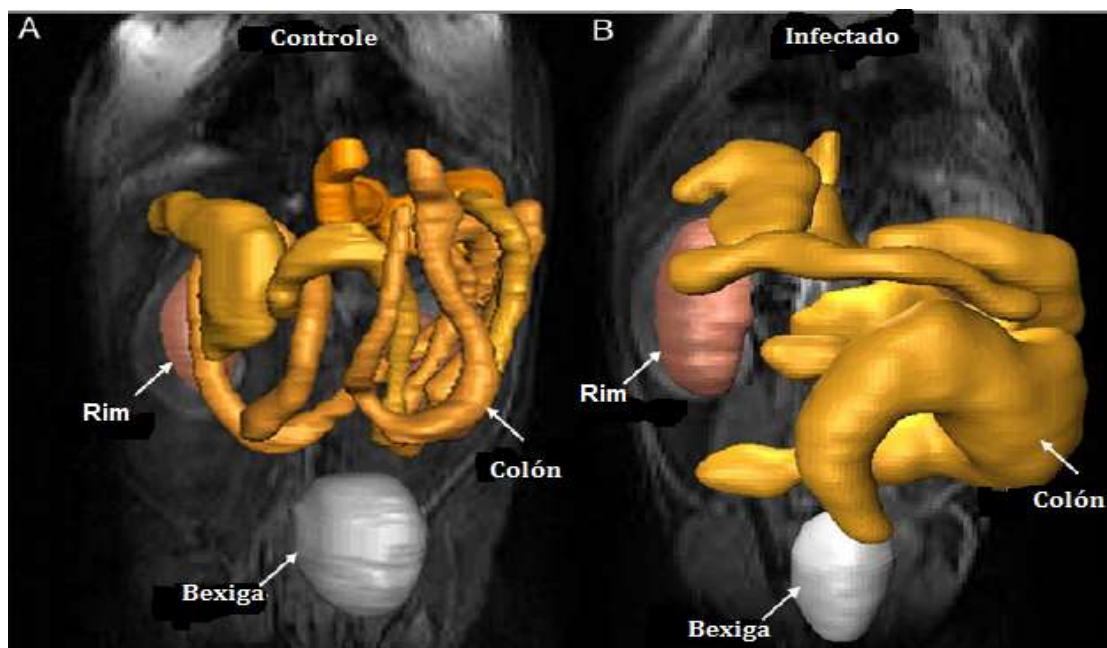
O trato gastrointestinal (TGI) é composto pela cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, reto e ânus, que são constituídos por mucosa, submucosa, muscular e serosa, além de órgãos glandulares associados como fígado, vesícula biliar, pâncreas e glândulas salivares. A função do TGI compreende a digestão e absorção de moléculas biologicamente ativas (nutrientes), que envolvem episódios de motilidade, peristaltismo, secreção de substâncias (água e enzimas) e digestão química, funções essas controladas por órgãos glandulares associados, produzindo hormônios regulatórios como o caso do pâncreas. Além do controle hormonal, existe ainda o controle neural do TGI efetuado pelo o sistema nervoso autônomo (SNA) - simpático ou parassimpático - além do sistema nervoso entérico (SNE), que esta disseminado ao longo do TGI (Figura 12). O SNE e o SNA dempenham suas funções de maneira dependente um do outro, uma vez que os neurônios do SNE são atingidos por axônios de neurônios sensoriais extrínsecos originados no sistema nervoso simpático (SNS) ou parassimpático (SNP), desta maneira o SNE regula a secreção, motilidade, fluxo sanguíneo e controle imunológico (FURNESS *et al.*, 2000; HANSEN *et al.*, 2003).



**Figura 12** - Representação esquemática da organização do SNE em um tecido saudável.

Fonte: extraído e adaptado de PAIVA, 2011.

Relacionado ao TGI, destaca-se outra importante manifestação clínica da doença de Chagas crônica, a forma digestiva, principalmente megacolon (Figura 13) e megaesôfago, (10 – 15% dos casos crônicos) em que se observa o aumento do volume do órgão, alterações na motilidade, dores, regurgitação, hipertrofia da musculatura lisa e atrofia da mucosa causada em virtude da destruição neural (SNE) dos plexos mucoso, submucoso e mioentérico, alterações essas que podem ser geradas por meio de processo imunológico, em razão da presença de parasitos intracelulares ou correspondente ao próprio parasitismo celular que causa danos nos tecidos (RASSI JR *et al.*, 2010; JELICKS; TANOWISZ, 2011; PAIVA *et al.*, 2011, 2014).



**Figura 13** - Imagem por ressonância magnética (MRI) com sobreposição tridimensional do colón, rim e bexiga de ratos. (A) não infectados e (B) infectados cronicamente com *T. cruzi*.

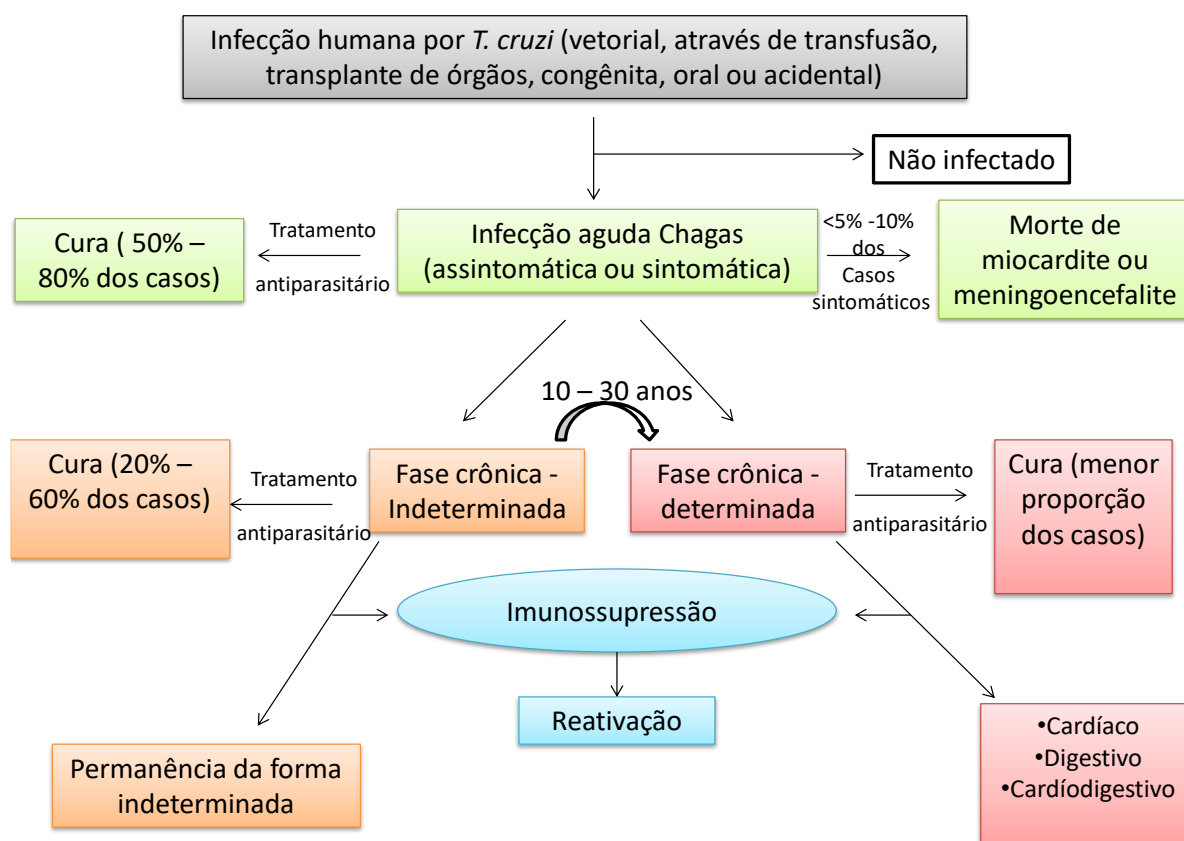
Fonte: extraído de JELICKS e TANOWISZ, 2011.

A localização da dilatação, aumento do volume do órgão/tecido, relacionada com a doença de Chagas crônica digestiva permanece desconhecida, embora já se saiba que se trata da destruição dos neurônios e diminuição das células intersticiais de Cajal, hiperplasia das células musculares associadas à fibrose. Apesar de desempenhar um papel fisiológico crucial, o SNE pode não ser o único responsável pelos danos causados no megacolon ou megaesôfago (JELICKS; TANOWISZ, 2011).

#### 1.1.6. Imunossupressão na doença de Chagas crônico

Nos dias atuais, devido ao grande número de pacientes portadores de doenças imunossupressoras, como HIV/AIDS, e ao aumento no uso de medicamentos que acarretam efeito imunossupressor, como corticoide, a infecção pelo parasito tem sido considerada oportunista por alguns autores, ou até mesmo ocasiona reativação da doença, como parasitemia, mesmo na ausência de sintomas (ANDRADE *et al.*, 1997; 2011; PINAZO *et al.*, 2013, SCARIM *et al.*, 2018).

Há relatos de uma gradual relação da doença de Chagas com manifestações neoplásicas em pacientes infectados. Os conhecimentos sobre tal relação, e de como a resposta imune induzida pela parasitose altera o desenvolvimento das neoplasias. Estudos recentes apontam três possibilidades: a neoplásia como uma possível causa de imunossupressão seguida de reativação da infecção, o surgimento das doenças neoplásicas por consequência do tratamento com benznidazol, associado ou não com fármacos imunossupressores; e, por fim, seria a neoplasia como uma condição de maior incidência sobre os indivíduos infectados (PINAZO *et al.*, 2013). O fluxograma (diagrama) a seguir representa a evolução clínica da doença de Chagas, fatos até então compreendidos (Figura 14).



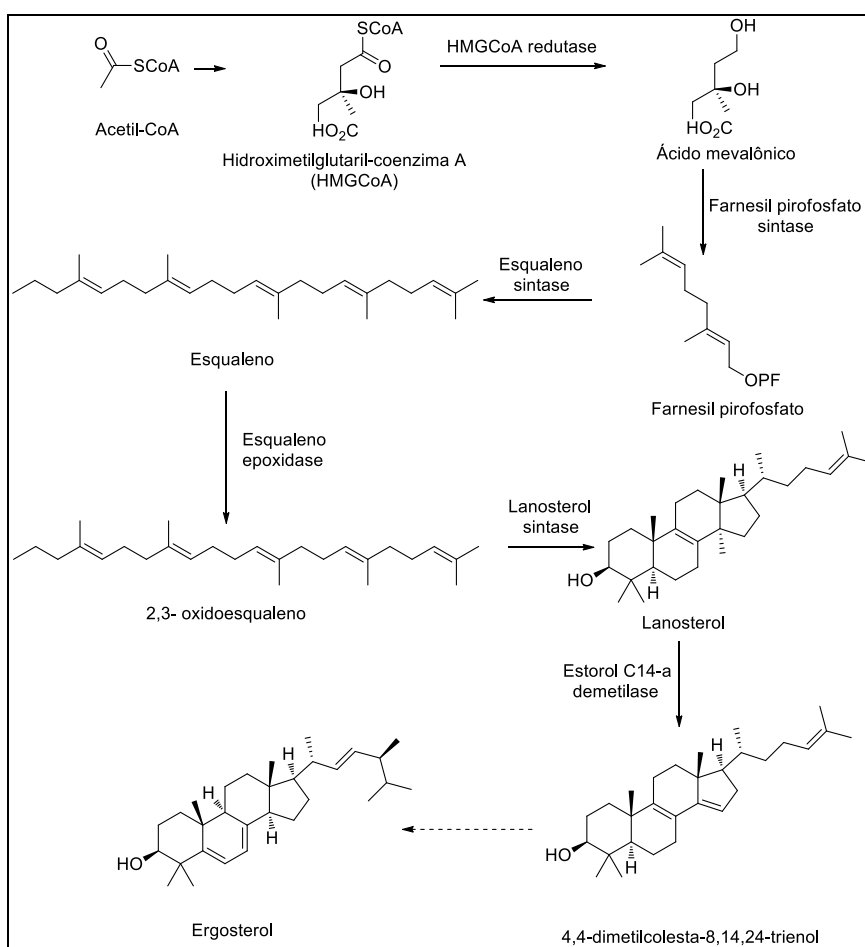
**Figura 14** - Ciclo natural da doença de Chagas no homem.  
Fonte: extraído e adaptado de HABERLAND *et al.*, (2013).

### 1.1.7. Alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos contra doença de Chagas

Estão descritas a seguir algumas vias metabólicas e alguns alvos terapêuticos explorados no planejamento e elaboração de novos fármacos antichagásicos.

#### Biossíntese do Ergosterol

O *T. cruzi* é dependente de uma variedade de esteróis específicos, como o ergosterol, essencial para a formação de membranas. Atuam na estabilização, fluidez e permeabilidade e ainda modulam as atividades de receptores e canais iônicos, ou seja, desempenham papel importante no desenvolvimento e proliferação do parasito (LEPESHEVA *et al.*, 2007). Os principais alvos dessa via metabólica estão expressos a seguir (Figura 15):

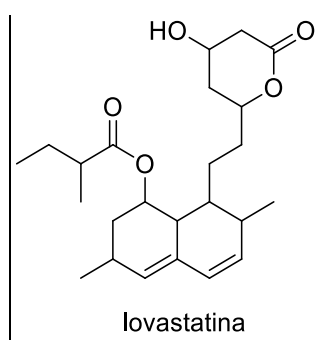


**Figura 15** - Alvos terapêuticos da via da biossíntese de ergosterol.

Fonte: extraído e adaptado de SÁNCHEZ-SANCHO *et al.*, 2010.



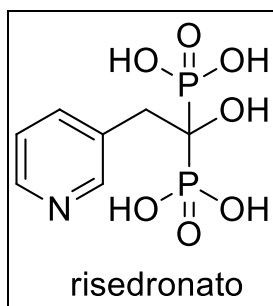
Um modelo de fármaco que atua sobre a enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase em *T. cruzi* é a lovastatina (Figura 16). Em estudos *in vitro* e *in vivo*, desenvolvidos por Urbina *et al.* (2003) demonstraram atividade da lovastatina na inibição da biossíntese do ergosterol, atuando na inibição da enzima CYP450. Observou-se inibição total da lovastatina em doses diferentes, 50  $\mu\text{M}$  e 70  $\mu\text{M}$  com 144 h e 96 h de exposição, e associado com cetoconazol em 144 h de exposição. Já quando avaliados quanto à inibição das formas amastigotas, não se mostrou efetiva, utilizando doses de até 1  $\mu\text{M}$ , pois, acima dessa dose apresentou-se citotóxica. Na avaliação *in vivo*, a lovastatina sozinha apresentou 50% de mortalidade, enquanto quando associada ao cetoconazol resulta em 100% de sobrevivência (URBINA *et al.*, 2003).



**Figura 16** - Estrutura química da lovastatina.

Fonte: autor.

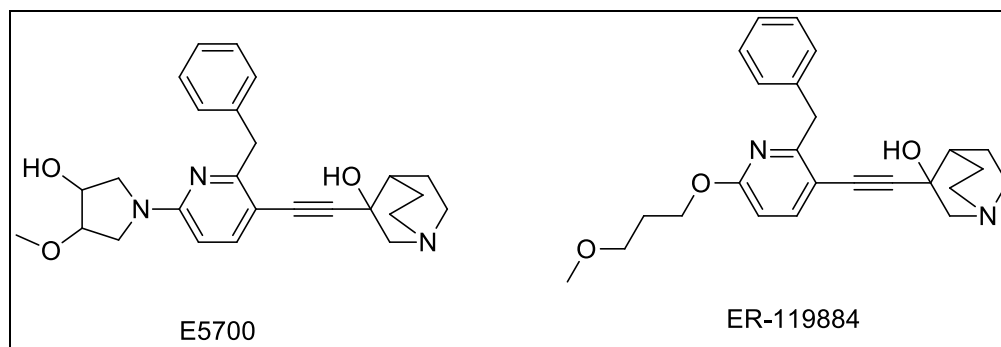
Estudos de derivados bifosfonados, como exemplo o risedronato (Figura 17), foram realizados quanto à inibição da enzima farnesil pirofosfato sintase (FPFS), resultando em uma atividade inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) de  $0,037 \pm 0,003 \mu\text{M}$ , de *T. cruzi* em modelo *in vitro* (MONTALVETTI *et al.*, 2001). Posteriormente Garzoni e colaboradores (2004) avaliaram a atividade tripanomicida do risedronato *in vitro* em formas epimastigotas e amastigotas e constataram inibição dose dependente para ambas formas, sem indícios tóxicos para as células hospedeiras empregadas. Outro estudo, utilizando risedronato em modelo agudo – 10 mg/kg/dia por 7 dias - (*in vivo*) apontou diminuição de 96,6% da parasitemia em relação ao controle e, também, a diminuição da mortalidade de 90% para 10%, comparando os grupos controle e tratado (GARZONI *et al.*, 2004).



**Figura 17** - Estrutura química do risedronato.

Fonte: autor

Dois compostos derivados quinuclidínicos, E5700 e ER-119884 (Figura 18), foram avaliados quanto à atividade inibitória da enzima esqualeno sintase, os quais apresentaram  $IC_{50}$  na faixa de nanomolar na avaliação *in vitro* (epimastigotas) ambos com atividade ( $IC_{50} = 8$  nM do E5700 e  $IC_{50} = 11$ nM do ER-119884) (URBINA, 2004).

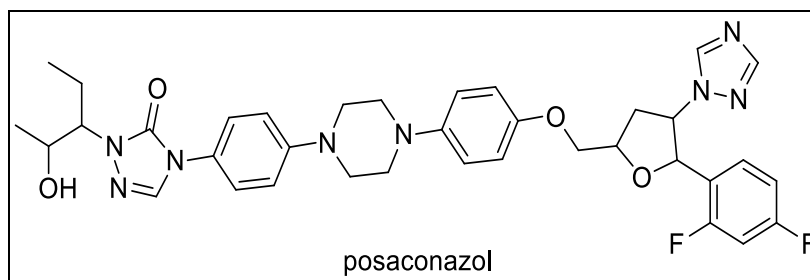


**Figura 18** - Estrutura química dos compostos E5700 e ER-119884.

Fonte: autor

Representantes azóis (cetoconazol, itraconazol, posaconazol) possuem atividade perante à enzima esterol C14- $\alpha$  demetilase. Estudos realizados por Sanchez-Sancho *et al* (2010) apontam atividade do posaconazol (Figura19) contra o *T. cruzi* em estudos *in vivo* em modelo crônico, sendo até utilizado em estudos de fase clínica para o tratamento da doença. O posaconazol (Figura19) apresentou atividade contra *T. cruzi* durante o tratamento, mas foi ineficaz a longo prazo nos portadores chagásicos assintomáticos. A monoterapia com o composto padrão, benznidazol, foi superior ao posaconazol, com elevados índices de conversão dos resultados de PCR sustentadas no período de um ano. Assim, os efeitos colaterais levaram à descontinuação da quimioterapia em 32%. Poranto, não foram

observadas vantagens com a terapia combinada versus monoterapia com benznidazol. Também comparando o composto padrão, benznidazol, ao posaconazol, Francisco *et al.* (2015) realizaram estudos em modelo animal infectados com a cepas CL Brener luc bioluminescente de *T. cruzi*, que constatou, novamente, a ineficácia do composto posaconazole contra doença de Chagas, em ambos os estágios da doença.



**Figura 19** - Estrutura química do posaconazol.

Fonte: autor

### *Tripanotiona redutase*

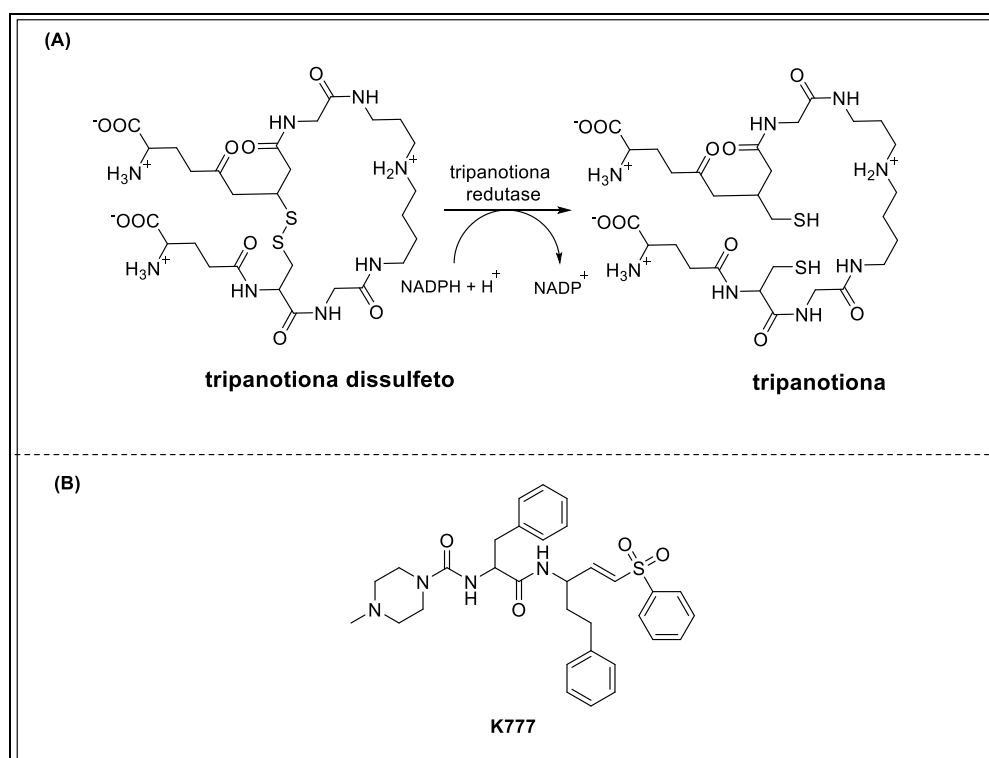
A tripanotiona é uma substância que atua como a glutatona, sendo a segunda presente em diversos organismos. A tripanotiona possui massa molecular relativamente baixa e apresenta funções específicas no organismo do parasito, como participação em processos regulatórios, defesa contra agentes oxidantes, metais pesados e outros xenobióticos. A redução do substrato tripanotiona dissulfeto, catalisada pela *tripanotiona redutase* por meio de mecanismo NADPH dependente (Figura 20), é fundamental para a manutenção e conservação do ambiente intracelular do *T. cruzi* (KRAUTH-SIEGEL; INHOFT, 2003; PITA; PASCUTTI, 2012).

### *Cisteína protease*

A cruzipaina ou cruzaina é a principal cisteína protease encontrada no *T. cruzi* e participa efetivamente na invasão e reprodução do parasita. A utilização de cisteínas proteases como alvo da terapia tripanossomicida foi validada a partir de diversos estudos que demonstraram resultados consistentes que a perda da atividade dessa enzima, por inibição ou por deleção de genes, causa diminuição significativa da capacidade infectante e da sobrevivência do parasita (LIMA; REIS; COSTA, 2013).

Diversos estudos demonstram a atividade de diferentes classes de moléculas, como dipeptídeos, tiossemicarbazona e vinilsulfonas na inibição de cisteínas proteases em diversos parasitas (LIMA; REIS; COSTA, 2013).

O inibidor irreversível de cruzipaina K777 (10) (Figura 20) é um derivado vinil sulfona que apresentou atividade contra formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi*. Além disso, o composto foi capaz de diminuir o número de parasitos no sangue e prolongar a sobrevivência em modelos animais (ENGEL *et al.*, 1998; BARR *et al.*, 2005). Apesar da sua eficácia *in vivo*, os estudos com o composto K777 não prosseguiram para os ensaios clínicos devido a elevada hepatotoxicidade apresentada. Estudos recentes têm proposto dois novos inibidores da cruzipaina: a benidipina e clofazimina. Ambos os candidatos foram capazes de reduzir a carga parasitária nos músculos cardíacos e esqueléticos de camundongos cronicamente infectados em comparação com camundongos não tratados, bem como diminuir o processo inflamatório nestes tecidos. Novos estudos devem ser realizados para estudar o sinergismo com benzonidazol e nifurtimox em vista terapias combinadas.



**Figura 20** – (A) Redução de tripanotona dissulfeto para ditiol tripanotona pela enzima tripanotona reductase. (B) Estrutura química do K777.

Fonte: extraído e adaptado de KRAUTH-SIEGEL, INHOFT, 2003; e ENGEL *et al.*, 1998; BARR *et al.*, 2005).

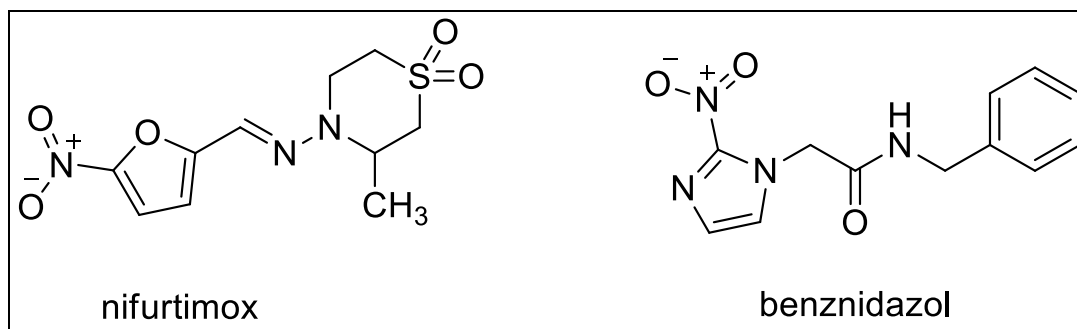
Outros alvos terapêuticos incluem a trans-sialidase, glicólise, absorção de purinas, a biossíntese de lipídeos assim como os ligantes de DNA, o metabolismo de poliaminas e a via das pentoses fosfato. Além disso, recentemente, os pesquisadores estão utilizando alvos epigenéticos, com exemplo as situínas (SIRT), para obtenção de novos compostos anti-*T. cruzi*.

#### 1.1.8. Realidade terapêutica contra a doença de Chagas e novas perspectivas

Posterior à descoberta da doença de Chagas, em 1909, houve uma busca por moléculas eficazes para regular ou combater tal parasitose. As moléculas pioneiras para os testes com *T. cruzi* foram o cloreto de mercúrio, fucsina, tartarato de antimônio potássico e arsênico, porém nenhuma molécula demonstrou atividade. Até 1960, um número inestimável de substâncias químicas, extratos e combinações foram testados em ensaios *in vitro* e *in vivo* e clinicamente, obtendo resultados questionáveis, duvidosos e grande parte inexpressivos (ANDRADE *et al.*, 1996; COURA; CASTRO, 2002; COURA, 2009).

Apesar da evolução na ciência investigativa para compreensão de tal patologia, como o amplo conhecimento sobre seus alvos terapêuticos, mutações e tropismo das cepas, na doença de Chagas ainda há pouco incentivo na pesquisa e desenvolvimento para novas moléculas terapêuticas, bem como a falta interesse de indústrias farmacêuticas em investir na pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas direcionadas para doenças negligenciadas (URBINA, 2010).

O tratamento da doença de Chagas continua sendo um desafio para a ciência. Desde a década de 1970 até os dias atuais, apenas dois fármacos foram aprovados no mundo para o tratamento da doença, o nitrofurano nifurtimox [3-metil-4-(5-nitro furfurilideno- amino)-tetra-hidro-4H-I, 4-tiazina-1,1 dióxido] e o benznidazol [N-benzil-2-nitroimidazol acetamida], um derivado nitroimidazólico (Figura 21) (CASTRO *et al.*, 2006; WHO, 2015).



**Figura 21** - Estruturas químicas do nifurtimox e benznidazol.

Fonte: autor.

Esse fato comprova a falta de incentivo no tratamento dessa enfermidade. Outra evidência foi a retirada do produto benznidazol do mercado, em 2008, pela indústria farmacêutica Roche em virtude da baixa rentabilidade. Desta maneira, o produto passou a ser produzido pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco, 2013), um laboratório oficial público, sendo esse o único produtor mundial do medicamento em questão (Governo do Estado de Pernambuco, 2013). Em 2008, a produção do medicamento pediátrico na dose infantil foi aprovada em parceria do DNDi e o LAFEPE, que passaram a distribuí-las em 2011 (DNDi, 2008)

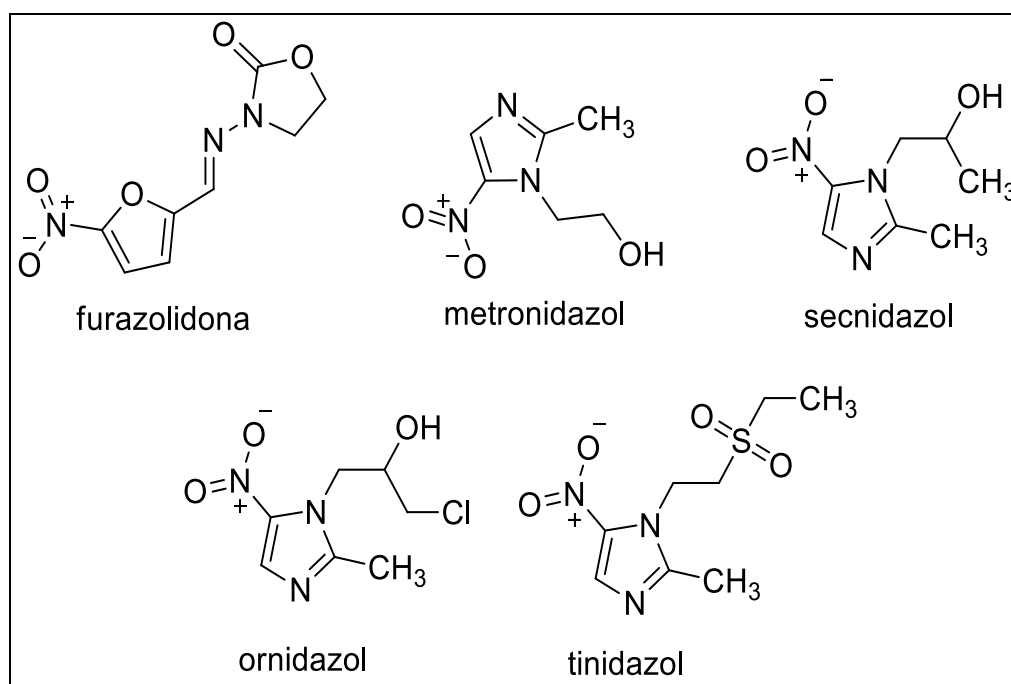
O mecanismo de ação do nifurtimox é baseado na formação de radicais livres, superóxidos e peróxido de hidrogênio, os quais atuam danificando macromoléculas como proteínas, lipídios e até mesmo DNA, por meio da ação das nitrorredutases presentes no interior das células (MAYA, *et al.*, 2007). No entanto, sua comercialização é restringida aos Estados Unidos, uma vez que as cepas brasileiras passaram a desenvolver resistência ao fármaco (COURA, 2009).

Contudo, o mecanismo de ação do benznidazol é diferente do nifurtimox, sendo este independente da formação de radicais livres. Acredita-se que sua ação esta associada à ligação covalente das macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA) aos metabólitos formados da redução pelas nitrorredutase. Constatou-se a inibição da enzima NADH-furamato redutase do *T. cruzi* pelo benznidazol, além de favorecer a fagocitose e intensificar a atividade do gama-interferona (IFN- $\gamma$ ) contra o parasito (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; MAYA *et al.*, 2007).

Embora existam estes fármacos no mercado, suas ações são, principalmente, associadas à fase aguda da doença de Chagas, além de apresentarem diversos efeitos adversos, que quando graves causam a interrupção do tratamento. Entre os efeitos adversos estão: anorexia e perda de peso, náusea e vômitos, excitação

nervosa, insônia, depressões, convulsões, vertigens, cefaléias, sonolência, mialgias, perda de equilíbrio, desorientação, esquecimento, parestesias, adinamias, neuropatias periféricas, gastralgia, edema de mucosa, intolerância hepática e manifestações cutâneas (COURA; CASTRO, S., 2002, URBINA *et al.*, 2003; CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006). Entretanto, apesar dos inconvenientes efeitos adversos, até o momento não existem fármacos aprovados com atividade superior ao nifurtimox e ao benznidazol (MAYA *et al.*, 2010).

Neste contexto, estudos realizados por Raether e Hanel (2003) apontam os compostos nitro-heterocíclicos, como agentes terapêuticos utilizados contra uma grande variedade de protozoários e bactérias anaeróbias, patogênicas em humanos e animais. Como o benznidazol, nifurtimox (Figura 21), há furazolidona, metronidazol, secnidazol, ornidazol e tinidazol (Figura 22), sendo todas moléculas derivados dos 5- e 2-nitroimidazol e do 5-nitrofurano.



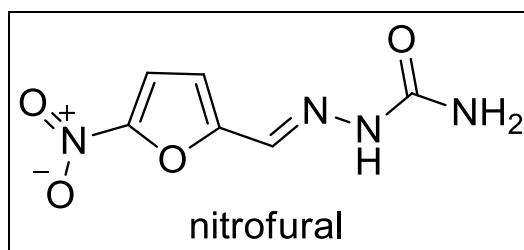
**Figura 22** - Estrutura química dos compostos nitro-heterocíclicos utilizados como antiprotozoários e antimicrobianos.

Fonte: extraído e adaptado de RAETHER e HANEL (2003).

Compostos com grupo nitro (NO<sub>2</sub>) são conhecidos por apresentar maior toxicidade. No entanto, existem muitos exemplos desse grupo na terapêutica. (BOSQUESI, 2009, SCARIM *et al.*, 2019). O nitrofuril ou nitrofurazona (NF) (Figura 23) (*5-nitro-4-furaldeído-semicarbazona*) foi o primeiro derivado nitrofurânico

introduzido na terapia, sintetizado, em 1944, por Dodd e Stilman. Em 1961, Brener demonstrou que o nitrofurais era eficaz na inativação do *T. cruzi* em um experimento *in vivo*, em que o NF foi administrado durante 53 dias (100 mg/kg/dia) em ratos infectados com *T. cruzi*, observado-se a cura de 95,4% dos animais.

Outro estudo realizado em 1969, por Andrade e Brener, mostrou que a atividade tripanossomicida do nitrofurais (Figura 23) tornava o *T. cruzi* inativo. O mecanismo de ação do NF se dá por meio da redução do grupamento nitro por enzimas nitrorredutases, levando à produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo, que causa desequilíbrio nas defesas antioxidantes de *T. cruzi*. Segundo estudos recentemente publicados, o NF age inibindo a enzima tripanotiona redutase e a enzima cruzipaína presente no parasito (HENDERSON *et al.*, 1988; LA-SCALEA, 2005; IGOILLO-ESTEVE *et al.*, 2007; TROSSINI *et al.*, 2010).



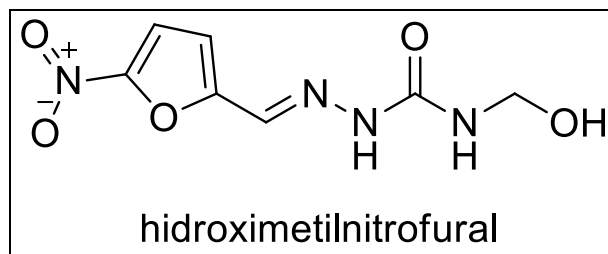
**Figura 23** - Estrutura química do nitrofurais (NF).

Fonte: autor.

Em busca de uma nova terapêutica para doença de Chagas, Chung (1996) sintetizou uma serie de pró-farmacos recíprocos de nitrofurais (NF) e primaquina, utilizando como grupo espaçante aminoácidos e dipeptídeos, aplicando a técnica de modificação molecular denominada de "latenciação" (CHUNG *et al.* 2005). Essa metodologia transforma quimicamente o fármaco em uma espécie inativa (pró-fármaco), que, *in vivo*, e perante ação química ou enzimática, se converte na forma ativa, melhorando as propriedades físico-químicas, biodisponibilidade com diminuição de toxicidade entre outras propriedades (CHUNG *et al.* 2005). Neste estudo identificou-se atividade do intermediário de síntese, hidroximetilnitrofurais (NFOH) (Figura 24), como um potencial agente tripanomicida em ensaios *in vitro*. O



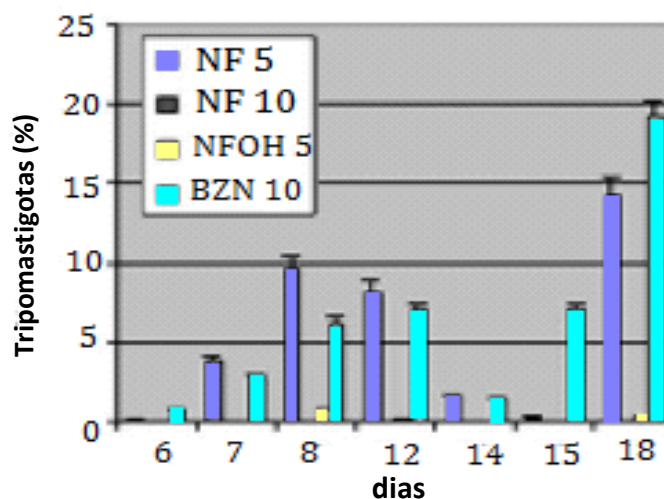
NFOH foi identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , análise elementar, espectrometria no infravermelho e massas (MS) (CHUNG *et al.*, 2003).



**Figura 24** - Estrutura química do hidroximetilnitrofural (NFOH).

Fonte: autor

Chung e colaboradores (2003) realizaram ensaios *in vitro* com as formas *tripomastigotas*, em que o intermediário de síntese NFOH, na concentração de  $5\ \mu\text{M}$ , apresentou atividade equivalente ao NF, com o dobro da concentração ( $10\ \mu\text{M}$ ) (Figura 25).

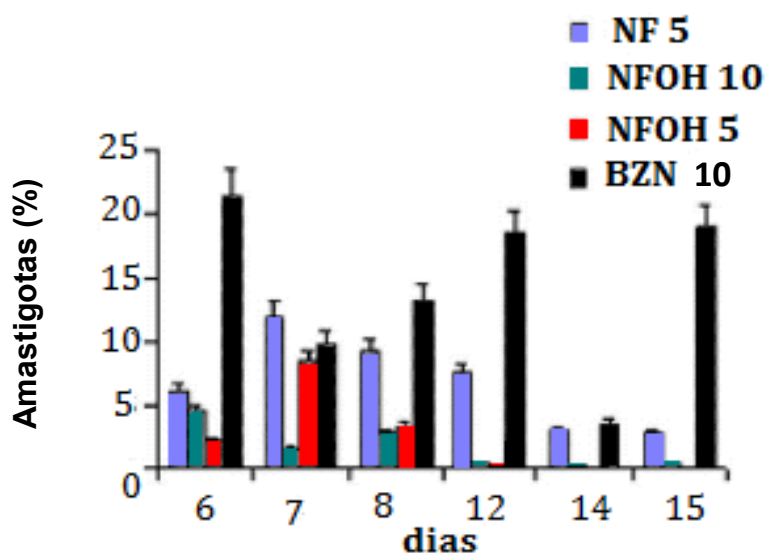


**Figura 25** - Efeito de  $5\ \mu\text{M}$  NF,  $10\ \mu\text{M}$  NF,  $5\ \mu\text{M}$  NFOH e  $10\ \mu\text{M}$  BZN) em porcentagem de tripomastigotas pós-infecção das células com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Controle positivo não expresso: 100%.

Fonte: extraído e adaptado de Chung *et al.*, 2003.

No mesmo estudo foi avaliada, *in vitro*, a atividade desses compostos conforme atividade contra formas amastigotas (Figura 26) apontando o NF e o seu

derivado (NFOH) com 97,2%, 99,6%, e 100% para 5  $\mu$ M NF, 10  $\mu$ M NF e 5  $\mu$ M NFOH, respectivamente, já o composto padrão (BZN 10  $\mu$ M) apresentou atividade significativamente inferior (81,1%) (CHUNG *et al.*, 2003).



**Figura 26** - Efeito de 5  $\mu$ M NF, 10  $\mu$ M NF, 5  $\mu$ M NFOH e 10  $\mu$ M BZN em porcentagem de amastigotas pós-infecção das células com formas amastigotas de *T. cruzi*. Controle positivo não expresso: 100%.

Fonte: extraído e adaptado de CHUNG *et al.*, 2003.

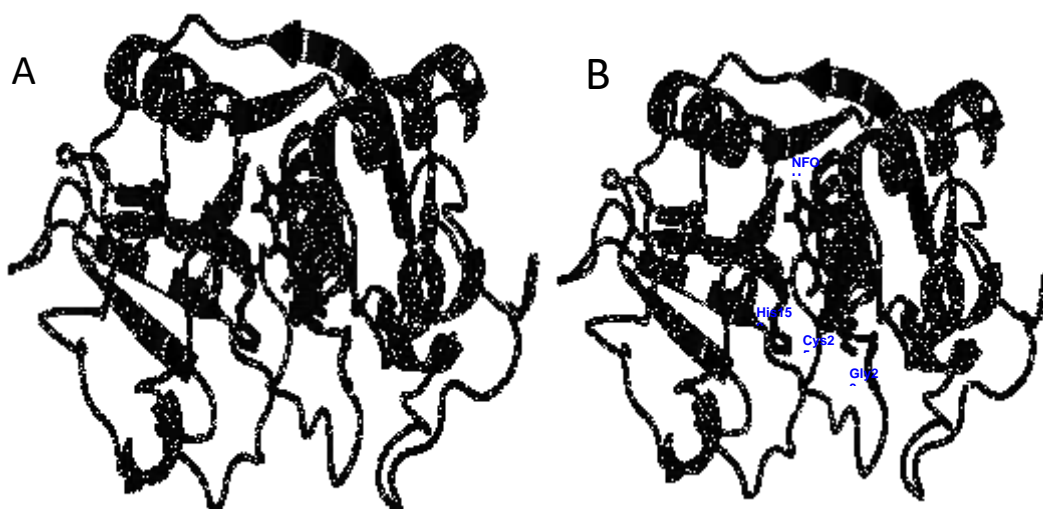
Esses trabalhos deram início a uma série de estudos do efeito do NFOH realizado no Lapdesf, Laboratório de Pesquisa de Novos Fármacos, FCF-UNESP em Araraquara-SP e com apoio de colaboradores de nossa e de outras instituições.

Considerando que a maturação de pré-RNA em tripanossomatídeos ocorre através de um processo chamado de trans-splicing, que envolve a excisão de íntrons e união dos exons em duas transcrições independentes. Baseado nesse processamento Barbosa e colaboradores (2007) estudaram a capacidade de NF e NFOH para atuar no processamento de RNA durante as reações de trans-splicing, em um estudo *in vitro*, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata. Além disso, o efeito desses compostos nos três estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* foi avaliado. Os resultados obtidos mostraram que NFOH interfere no processamento de RNA por uma inibição parcial da reação de trans-splicing, em cepas de *T. cruzi* Y e NCS. A atividade de NFOH é dependente da dose e é mais elevada do que a atividade de NF 12,5  $\mu$ M. As bandas de RNA também foram

quantificadas por absorvância, havendo a confirmação da variação da concentração de RNA. A análise da atividade biológica em culturas de células demonstrou que 5  $\mu\text{M}$  de NFOH foi tão eficaz quanto o dobro da concentração de NF em todas as fases do parasita, afetando desta maneira, o processamento de RNA nestes parasitas. Além disso, observou-se que após 15 dias de tratamento, a eficácia do NFOH foi ainda maior (Barbosa *et al.*, 2007).

O NFOH teve sua estrutura elucidada mediante cristalografia de raio-X por Doriguetto e colaboradores (2005). Estudando o comportamento voltamétrico do NF e do NFOH por voltametria cíclica, LA-Scalea *et al.* (2005) observaram redução do NF pH-dependente. Em meio ácido forma como principal produto o derivado hidroxilamínico, que envolve 4 elétrons. Em meio alcalino, a redução do NF primeiramente envolve um elétron para formar o nitro ânion radical e a segunda etapa corresponde à formação da hidroxilamina, com prévio tratamento do eletrodo de carbono vítreo. O NFOH apresentou comportamento voltamétrico similar e, de forma análoga, manifestando a mesma eletroatividade e capacidade de estabilização do nitro-radical, indicando que a modificação molecular do NF, adição do grupo hidroximetil, não introduziu alterações no seu comportamento voltamétrico (LA-SCALEA *et al.*, 2009).

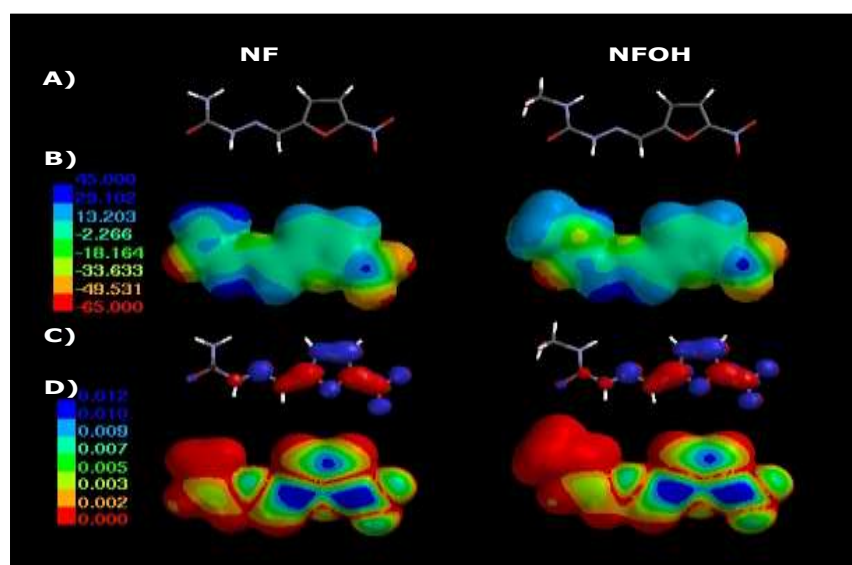
Trossini *et al.* (2010) realizaram estudos de modelagem molecular de estrutura cristalográfica, em que o derivado NFOH possui sua carbonila mais suscetível ao ataque nucleofílico da Cys25 da cruzaina em relação ao NF. Dessa maneira, certificou-se como possível responsável pela formação do ânion nitro-radical, podendo assim operar na inibição de cruzaina e de tripanotona redutase. Hidroxila (-OH) é ponto adicional de interação. A capacidade de inibição da enzima cruzaina foi testada por Trossini *et al.* (2010), que observaram inibição de 60% e 30% para NFOH e NF respectivamente (Figura 27).



**Figura 27** - Docking do NF (A) e NFOH (B), na enzima cruzaina presente em *T. cruzi*.

Fonte: extraído de TROSSINI *et al.*, 2010.

Os mapas de potenciais eletrostáticos de ambas as moléculas estão expressos na Figura 28, que sugere que o encaixe dessas moléculas com a enzima cruzaina pode apresentar maior afinidade de Cys-25 de cruzaina para a unidade de carbonila do NFOH, em virtude de uma menor densidade eletrônica quando comparada com o NF (TROSSINI *et al.*, 2010).

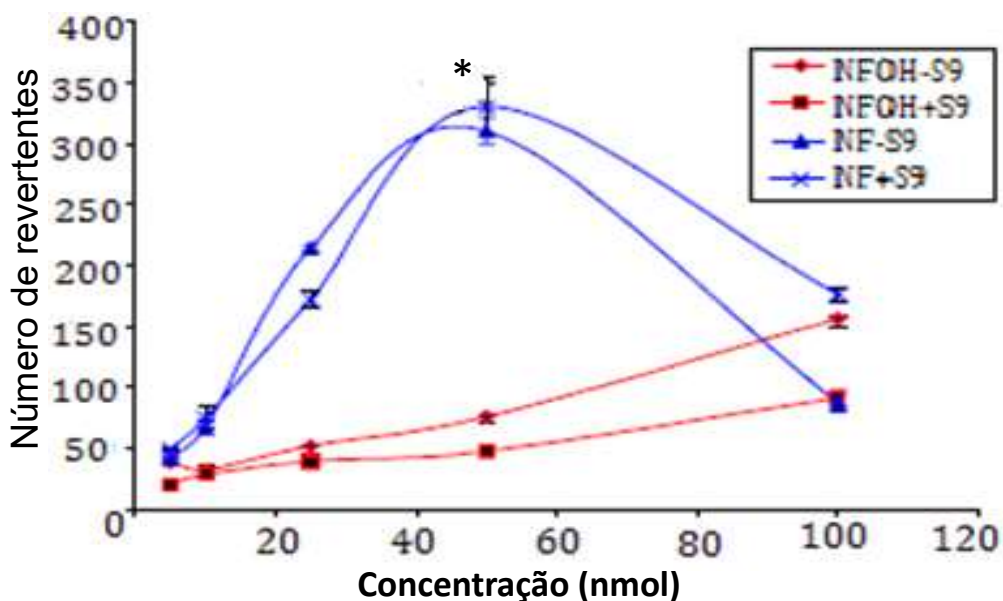


**Figura 28** - Mapas dos potenciais eletrostáticos do NF e NFOH.

Fonte: extraído de TROSSINI *et al.*, 2010.

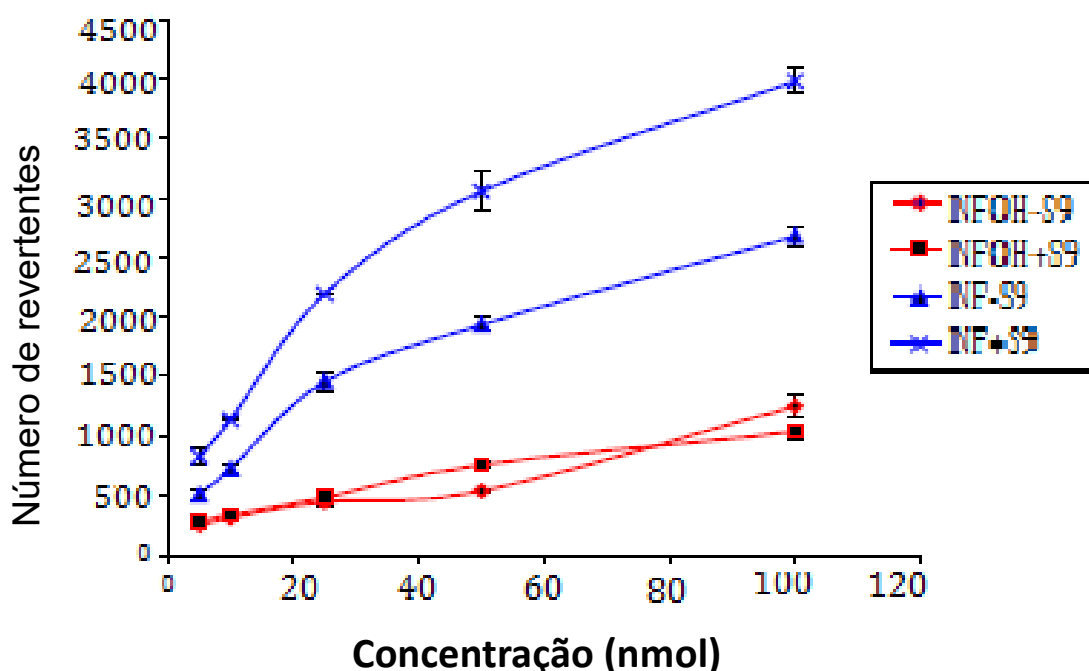
Os nitro-compostos ( $\text{NO}_2$ ), na maioria dos casos, podem gerar um alto índice de toxicidade, no entanto, existem muitos exemplos desse grupo em uso terapêutico. Provavelmente sua toxicidade seja ligada à presença de dois grupamentos com potenciais reativos: o grupo nitro na posição 5 e os grupos substituintes na posição 2 do anel furânico (BOSQUESI, 2009).

O teste de mutagenicidade (teste de Ames), *in vitro*, foi realizado utilizando-se *Salmonella typhimurium* (cepa TA98 e TA102 – Figuras 29 e 30, respectivamente) na ausência e presença da fração S9 de fígado de rato. Os resultados obtidos por Guido e colaboradores (2001) sugerem que a adição do grupamento hidroximetil no NF por latenciação, formando assim o NFOH, foi responsável por diminuir a atividade mutagênica em cerca de quatro vezes, nos ensaios com e sem ativação metabólica, em ambas linhagens testadas (GUIDO *et al.*, 2001).



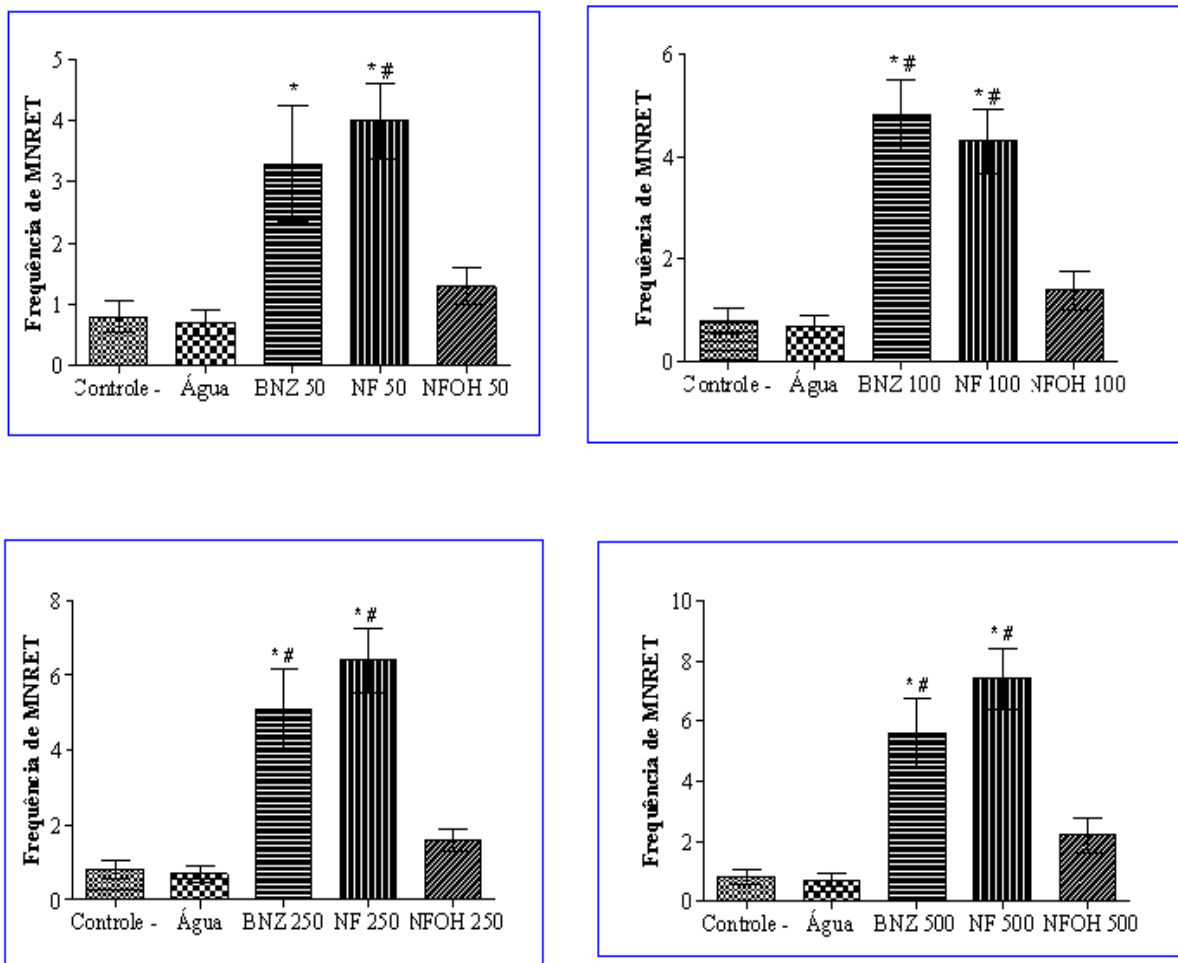
**Figura 29** - Atividade mutagênica (*S. typhimurium* cepa TA98) do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios com e sem ativação metabólica (S9). (\*) óbito animal.

Fonte: extraído e adaptado de GUIDO *et al.*, 2001



**Figura 30** - Atividade mutagênica (*S. typhimurium* TA102) do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios com e sem ativação metabólica (S9).  
Fonte: extraído e adaptado de GUIDO *et al.*, 2001.

O teste de Ames suporta a hipótese de que o pró-fármaco (NFOH) possui uma característica menos mutagênica à célula, quando comparado ao seu prototipo (NF) em ambas as cepas estudadas. Os compostos foram analisados, *in vivo* (micronúcleo), utilizando o modelo de genotoxicidade em micronúcleo, e foram avaliados quanto à capacidade de induzir mutações cromossômicas durante a fase de divisão celular. Enquanto foram encontrados presença de micronúcleo nos grupos BZN e NF, obteve-se ausência total de células micronucleadas no grupo NFOH, sendo que este apresentou o perfil mutagênico semelhante ao grupo que recebeu água (Figura 31) (BOSQUESI, 2009).



**Figura 31** - Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 50, 100, 250 e 500 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.

Fonte: extraído de BOSQUESI, 2009.

Além disso, no teste de toxicidade aguda, o NFOH foi considerado pouco tóxico, segundo critérios da OMS, com  $DL_{50}$  (dose letal para 50%) superior a 2000 mg/kg (MELO, 2006). Testes de toxicidade aguda (14, 28 e 60 dias), realizados com camundongos por vias oral, indicaram baixa toxicidade do derivado NFOH ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg) e alta para NF ( $DL_{50}$  556,3 mg/kg). Do mesmo modo, quando comparado via intraperitoneal o NFOH apresentou  $DL_{50}$  327 mg/kg enquanto o NF demonstrou  $DL_{50}$  197,2 mg/kg por esta via. Esses resultados justificam a continuidade dos testes pré-clínicos em outras espécies animais, como ratos e cães (MELO, 2006).

Em 2014, Davies *et al.* avaliaram a hepatotoxicidade do NFOH em modelos *in vitro* e *in vivo*. No ensaio *in vitro* foram utilizadas cultura de células HepG2 e os fármacos testados foram NFOH e BZN nas concentrações de 5 mM, 50 mM e 100 mM, com objetivo de avaliar a quantidade gerada de espécies reativas de oxigênio e de danos ao DNA celular. Apesar das células tratadas com BZN não manifestarem variação na capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, esta se mostrou capaz de diminuir a viabilidade celular, exibindo 33% de morte celular, quando administrado em dose de 100 mM. Em análise *in vivo* em que foram avaliados grupos com administração de NFOH (150 mg/kg/dia), BZN (150 mg/kg/dia) e controle positivo durante dois períodos distintos, sendo um de curto prazo (21 dias) e outro de longo prazo (60 dias). Avaliaram-se os danos no tecido hepático quanto às enzimas TGO e TGP, medidas de mieloperoxidase (MPO), atividade e estresse oxidativo, citocina antiinflamatória TNF- $\alpha$  e por fim análise histopatológica. Os resultados obtidos revelaram aumento dos níveis de TGP no grupo tratado com BZN em longo prazo, no entanto, o NFOH não apresentou variação significativa nos níveis de TGO e TGP, tanto para curto quanto para longo prazo de tratamento, quando comparados aos controles. O grupo BZN no tratamento tanto a curto prazo, mas, principalmente, a longo prazo acarretou uma vasta concentração de citocina antiinflamatória TNF- $\alpha$  e infiltrados inflamatórios em relação ao grupo NFOH. Por fim, pode-se concluir que o tratamento com BZN induz a inflamação crônica e lesão hepática, diferentemente do NFOH que não apresentou hepatotoxicidade (DAVIES *et al.*, 2014).

Os dados, *in vivo*, de farmacocinética do composto apontam que o NFOH atinge um *Tmax* de concentração plasmática em 1 hora contra 4 horas do NF, sugerindo absorção mais rápida para o NFOH. Sendo assim, o NFOH apresentou-se 20X mais biodisponível em relação ao NF, em ratos, e  $T_{1/2}$  pH 1,2=1,5 h;  $T_{1/2}$  pH 7,4=134 h;  $T_{1/2}$  em plasma de rato = 48 h. Já em coelhos a biodistribuição do NFOH foi 10% maior em relação ao NF (SERAFIM *et al.*, 2008, 2013).

Nogueira-Filho e colaboradores (2013) realizaram ensaios farmacocinéticos pré-clínicos em coelhos albinos, avaliando, desta maneira, o perfil farmacocinético quanto à administração do NFOH oral, NF proveniente de NFOH oral, NF oral, NFOH i.v. e NF proveniente de NFOH i.v. e, por fim, NF i.v. Dentre todos os resultados obtidos, o mais satisfatório foi a biodisponibilidade oral do NF a partir do NFOH, que foi de 60% (NOGUEIRA-FILHO *et al.*, 2013).



Também utilizando modelo *in vivo*, Davies e colaboradores (2010) induziram a infecção por *T. cruzi*, inoculando  $10^3$  formas tripomastigotas da cepa Taluhen, e dividiram o trabalho em quatro grupos (n = 12), sendo estes grupos tratados com NFOH (150 mg/kg/dia), NF (150 mg/kg/dia), BZN (60 mg/kg/dia) e um grupo controle positivo (Veículo – 5% NaCl em tween 80). Já nos grupos dos animais não infectados, para avaliação da enzima TGO em relação ao uso dos compostos, todos os grupos permaneceram com a mesma concentração, com exceção do grupo NF que após observação de um grande número de óbitos nos animais infectados que recebiam 150 mg/kg/dia, a concentração diária foi reduzida para 45 mg/kg/dia. Ambos os protocolos, com infecção e sem infecção, receberam seis doses por semana até completarem 60 dias de tratamento. O tratamento teve início após cinco dias da infecção e todos os compostos foram administrados por via oral (DAVIES *et al.*, 2010).

Os resultados apontam similaridade entre os grupos NFOH e BZN no combate à parasitemia (fase aguda), visto que houve ausência de formas circulantes de *T. cruzi* durante as análises parasitêmicas e com exame de PCR negativos. E em relação à taxa de mortalidade, destacou-se o grupo NFOH (16%), sendo que os níveis para BZN, NF e controle positivo foram de 33%, 75% e 66% respectivamente. As análises moleculares (PCR) foram realizadas, e os resultados demonstraram 90% e 100% de cura após 30 e 180 dias após o tratamento com NFOH, respectivamente. O composto padrão, benznidazol, apresentou cura (100%) em ambos períodos (DAVIES *et al.*, 2010).

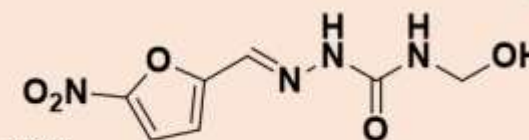
Recentemente, Scarim e colaboradores (2018) realizaram estudo do efeito de NFOH (150 mg/kg) e BZN (60 mg/kg), durante a forma indeterminada da fase crônica da doença de Chagas em camundongos (Balb/c) com a cepa Y de *T. cruzi*, imunossuprimidos com dexametasona (5 mg/kg) por 14 dias, após o tratamento de 60 dias. Os resultados mostraram reativação da doença, durante a imunossupressão, apenas no grupo infectado não tratado. Durante as análises histopatológicas os ninhos de amastigotas foram encontrados no coração, cólon, fígado e músculo no grupo infectado não tratado e no coração e fígado do grupo infectado tratado com BZN. Curiosamente, ninhos amastigotas não foram encontrados no grupo infectado tratado com NFOH e no grupo não infectado. A análise histopatológica mostrou menos lesões teciduais e infiltrados parasitários no grupo infectado tratado com NFOH quando comparado com os grupos infectados

tratados com BZN e grupo infectado não tratado. Não observamos nenhum aumento nos níveis de biomarcadores de lesão hepatocelular (TGO/TGP) no grupo NFOH (SCARIM *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos até o momento sugerem o NFOH como um potencial candidato para estudos clínicos. Entretanto, outros ensaios pré-clínicos como o de segurança toxicológica segundo padrões de exigências da ANVISA, os de mecanismo de ação ao nível molecular e metabolismo ao nível molecular, ainda devem ser realizados no sentido de se conhecer melhor esse composto na forma indeterminada e determinada da fase crônica da doença de Chagas. Os principais estudos a respeito do NFOH, realizados por nosso laboratório e colaboradores desde 1996 até os dias atuais, estão indicados na Figura 32, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho.

**Síntese e caracterização**

- Síntese e identificação (CHUNG, 1996)
- Comportamento voltamétrico similar ao NF (LA-SCALEA et al., 2009)
- Determinação da solubilidade (MELO, 2006)
- Estudo computacional indica: ataque nucleofílico da Cys25 da cruzaina a carbonila do NFOH (TROSSINI et al., 2010)
- Otimização da síntese do NFOH (TROSSINI et al., 2010)

**Atividade biológica**

- Atividade tripanomicida contra formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (*in vitro*): mais ativo que o BZN (CHUNG et al., 2003)
- NFOH interfere no processamento do RNAm (BARBOSA et al., 2007; AMBROSIO et al., 2004)
- Inibição cruzipaina: NF 30% e NFOH 60% (TROSSINI et al., 2010)
- Atividade na fase aguda (*in vivo*), cura de 100% (PCR 180 após tratamento), diminuição da mortalidade de NFOH (DAVIES et al., 2010)
- Atividade fase crônica (*in vivo*), inibiu reativação parasitemia (durante imunossupressão), e diminuiu infiltrados e ninhos amastigotas (SCARIM, et al., 2018)

**Toxicidade e Farmacocinética**

- Teste de Ames (mutagenicidade – *in vitro*): NFOH quatro vezes menos mutagênico que o NF (GUIDO, et al., 2001)
- Ensaio *in vivo* de DL<sub>50</sub> > 2000mg/kg (NFOH)
- Ensaio de genotoxicidade (micronúcleo – *in vitro*): NFOH não é genotóxico, resultado comparado a água (BOSQUESI, 2009)
- 20x mais biodisponível em relação ao NF T<sub>1/2</sub> pH 1,2 = 1,5h; T<sub>1/2</sub> pH 7,4 = 134h; T<sub>1/2</sub> em plasma de rato = 48h (SERAFIM, 2013;2008)
- Biodisponibilidade oral do NF a partir do NFOH é de 60%; aumento de 10% na biodistribuição em coelhos (MACHADO, 2013)
- Não hepatotóxico durante 21 e 60 dias de tratamento com NFOH (150mg/kg) (DAVIES et al., 2014)
- Não eleva os níveis de TGP/TGP durante 60 e 21 dias de tratamento com NFOH (150mg/kg) (SCARIM et al., 2018; DAVIES, et al., 2014)

**Figura 32** - Trabalhos publicados com o candidato antichagásico hidroximetilnitrofural NFOH, em relação ao nitrofural (NF) e o Benznidazol (BNZ).

Fonte: extraído e adaptado de SCARIM, 2016.

## 2. Objetivo Geral

Estudo da atividade de NFOH em *in vitro*, e ensaio *in vivo* em fase aguda e crônica da doença de Chagas com as cepas de Bolívia e CL Brener luc bioluminescente de *T. cruzi* em camundongos.

### 2.1. Objetivos específicos

**2.1.1.** Ensaio de atividade do NFOH em modelo de fase aguda da doença de Chagas, utilizando a cepa Bolívia e camundongos Swiss e C57Bl6: acompanhamento de parasitemia, peso relativo, análise histopatológica dos órgãos: coração, cólon, músculos, fígado, baço, rins.

**2.1.1.1.** Confrontar e comparar os dados obtidos com o composto NFOH nas diferentes linhagens de camundongos, Swiss e C57Bl6, durante a fase aguda da infecção com a cepa Bolívia.

**2.1.2.** Ensaio de atividade do NFOH em modelo de fase crônica da doença de Chagas, utilizando a cepa Bolívia e camundongos Balb/c: acompanhamento de parasitemia, xenodiagnóstico, peso relativo, ensaio bioquímico (TGO e TGP), análise histopatológica dos órgãos: coração, cólon, músculos, fígado, baço, rins e cérebro.

**2.1.3.** Ensaio de atividade do NFOH, na fase aguda e crônica da doença de Chagas, utilizando cepa CL Brener bioluminescente, em ensaio parasitêmico por meio de imagem, análise *ex vivo* por meio de imagem e análise histopatológica dos órgãos: coração e fígado.

**2.1.4.** Compreender e discutir a atividade antichagásica do NFOH contra dois diferentes subtipos de *T. cruzi*: as cepas Bolívia (TcI) e CL-Brener bioluminescente (TcVI), em ambos os estágios da doença de Chagas experimental.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Reagentes

- formaldeído p.a. (Merck)
- metanol p.a. (Synth)
- acetona p.a (Synth)
- xilol (Synth)
- ácido acético (Synth)
- nitrofural p.a. (Merck)
- benznidazol (Sigma)
- carbonato de potássio p.a. (Synth).
- clorofórmio p.a. (Synth)
- água destilada
- soro fisiológico (0,9% - NaCl)
- dexametasona (Achē)
- goma arábica (Sigma)
- etanol 70%, 80%, 90% e absoluto.
- hematoxilina
- eosina
- parafina (Merck)
- d-luciferina
- isoflurane® USP (Rhône-Poulenc Chemicals Ltd.)

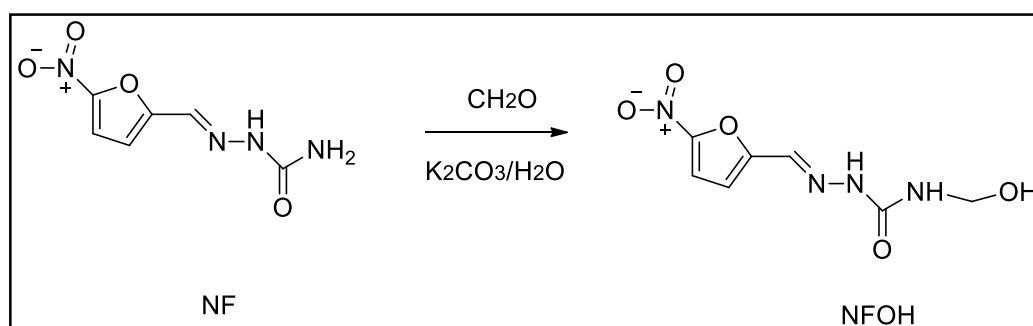
#### 3.2. Equipamentos e acessórios

- aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific®;
- balança analítica Marte® - modelo AY 220
- balança semi-analítica Gehaka® modelo BG 200
- sonificador Unique® modelo UltraSonic Cleaner
- micrótomo eletrônico 340E
- IVIS Lumina II system (Caliper Life Science)
- materiais cirurgicos (tesouras e pinças)

### 3.3. Método de obtenção de NFOH

O composto NFOH foi obtido e preparado de acordo com método desenvolvido por Chung (1996), exibido no esquema a seguir (Esquema 1). Deste modo, o NFOH foi sintetizado à temperatura ambiente, sob agitação por um período de 48 horas, por meio da reação de 1,08 g de nitrofural (NF) com 18 mL de formaldeído contendo 0,7 g de  $K_2CO_3$  e 10 mL de  $H_2O$ . Posteriormente, ao final da reação, a suspensão obtida foi filtrada e conseqüentemente foi refetuado recristalização de NFOH, com intuito de obter o produto puro.

Para isso, foi adotado da literatura (SCARIM, 2016), a metodologia para melhor rendimento da recristalização de NFOH, em que se misturaram 40 mL de acetona e 120 mL de metanol (25:75/v:v) a 80 °C, e adicionou-se 1,0 g de NFOH. Após total solubilização do NFOH, esperou-se a saturação da reação para então ser resfriada em banho de gelo. Posterior à precipitação, o produto foi filtrado, obtendo dessa maneira, 65% de rendimento do produto puro. O produto foi analisado por CCD, utilizando-se como sistema solvente  $CHCl_3$ :MeOH: $CH_3COOH$  (95:5:3/v:v:v) e faixa de fusão de 172-183 °C,  $R_f = 0,63$  e o rendimento da reação foi de 42% após recristalização.



**Esquema 1** - Síntese do NFOH.

Fonte: autor.

#### 3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Utilizaram-se placas de sílica-gel G-60, com 0,25 mm de espessura, e placas Alugram Nano-Sil G/UV 254 da Merck para o acompanhamento das reações, com os seguintes sistemas de eluentes (v/v/v):  $CHCl_3$ /MeOH/ $CH_3COOH$  (95:5:3);

(85:10:5); (70:20:10). As placas cromatográficas foram reveladas e observadas com iodo e/ou radiação UV.

### 3.3.2. Determinação da faixa de fusão

A faixa de fusão experimental do produto obtido foi determinada em aparelho para determinação de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific, sem correção.

### 3.3.3. Preparo dos compostos para administração no modelo animal

Para ambos os experimentos, **I** e **II**, os compostos administrados foram preparados diariamente, sendo estes suspensos em goma arábica 4% e depositados por, aproximadamente, cinco minutos no Sonicador Unique®, temperatura ambiente, para que fossem completamente solubilizados (SCARIM, 2016). A administração foi efetuada por via oral (gavage). Os compostos utilizados nos experimentos **III** e **IV** foram suspensos em hidroxipropilmetilcelulose (FRANCISCO *et al.*, 2015, 2016; LEWIS *et al.*, 2014, 2015) para que fossem completamente solubilizados. A administração foi realizada por gavage (via oral).

## 3.4. Ensaio biológico

Os ensaios biológicos foram divididos em 4 experimentos (**I-IV**), sendo:

**Experimento I:** Fase aguda, cepa Bolívia de *T. cruzi*, camundongos Swiss e C57Bl6;

**Experimento II:** Fase crônica, cepa Bolívia de *T. cruzi*, camundongos Balb/c isogênicos;

**Experimento III:** Fase aguda, cepa CL-Brener luc/bioluminescente de *T. cruzi*, camundongos Balb/c;

**Experimento IV:** Fase crônica, cepa CL-Brener luc/bioluminescente de *T. cruzi*, camundongos Balb/c.

Os experimentos III e IV foram realizados como parte do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE, CAPES), realizado na “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” (Department of Infection Biology in Faculty of Infectious and Tropical Diseases) - UNIVERSITY OF LONDON, cujo o número do processo é **88881.189584/2018-01**, com colaboração do Prof. Dr. John M. Kelly e a pesquisadora Dra. Amanda Fortes Francisco.

### **3.4.1. Caracterização biológica das cepas utilizadas**

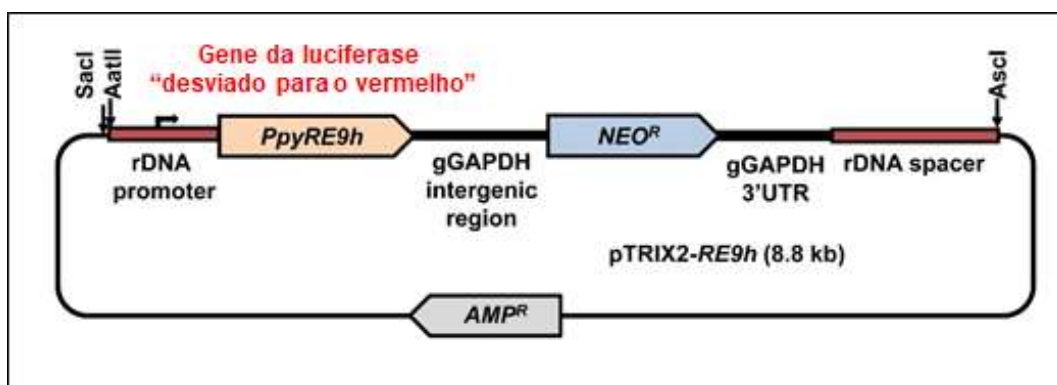
O inóculo parasitário para os experimentos I e II foram preparados no laboratório de Parasitologia, no biotério do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, com a colaboração do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

A cepa Bolívia de *T. cruzi*, pertencente ao grupo TcI, tem como característica o predomínio de formas tripomastigotas largas (FUNAYAMA; PRADO JUNIOR, 1974; ZINGALES, 1998). Foi realizada a padronização para o inóculo de  $1 \times 10^2$  formas tripomastigotas da cepa Bolívia. As formas parasitárias flageladas, os tripomastigotas metacíclicos, da cepa Bolívia foram isolados de fezes de *Triatoma infestans*, proveniente de Vitichi por Funayama e Prado Júnior (1974), e transferidas para meio de cultura axênico (LIT). Após a segregação, os parasitos de *T. cruzi* foram inseridos, via intraperitoneal em camundongos, e mantidos por meio de repiques constantes de cultura (LIT), bem como durante o pico parasitêmico (fase aguda). Neste caso, os repiques sanguíneos foram realizados por meio de punção cardíaca e o sangue infectado (padronizado) foi inoculado por via i.p. em outros camundongos jovens e saudáveis.

Para os experimentos III e IV, as cepas CL-Brener luc bioluminescentes de *T. cruzi*, pertencentes ao grupo TcVI, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado a 28 °C (KENDALL *et al.*, 1990), na “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” (Department of Infection Biology in Faculty of Infectious and Tropical Diseases) – University of London. As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas pela transferência de epimastigotas em crescimento exponencial para o meio de transformação (Graces-IH) a  $4 \times 10^6$  parasitas mL<sup>-1</sup> (ISOLA *et al.*, 1986). As formas tripomastigotas metacíclicas foram colhidas cerca de 4-7 dias após adição dos parasitos ao meio, e cerca de 70-90% dos parasitos se diferenciaram. As formas



tripomastigotas foram obtidas de mioblastos de músculo esquelético de ratos L6, crescidos em meio de cultura RPMI-1640, suplementado a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foi integrado o gene PpyRE9h no locus do rDNA (DNA ribossômico) de *T. cruzi* (cepa CL Brener), usando a construção *pTRIX2-RE9h* (Figura 33), sendo possível análise da dinâmica dos parasitos no organismo do animal, bem como a quantificação dos mesmos, por serem altamente sensíveis e expressarem luciferase (LEWIS *et al.*, 2014). Portanto, para a construção do parasito luminescente, o primeiro passo foi gerar e induzir o seu crescimento. Para estruturação da capacidade de bioluminescência, o vetor foi construído inserindo-se o gene da luciferase de “deslocamento vermelho” PpyRE9h na região ribossômica (rDNA) da cepa de *T. cruzi* CL Brener luc (LEWIS *et al.*, 2014).



**Figura 33** - Construção do parasito luminescente: CL Brener luc (TcVI) bioluminescente.

Fonte: extraído e adaptado de LEWIS *et al.*, 2014

### 3.4.2. Animais utilizados

**Experimento I.** Para este estudo, utilizaram-se 60 camundongos de duas linhagens diferentes: 30 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fusiformes (N = 30), e 30 camundongos C57Bl6, isogênicos (N = 30). Para ambas as linhagens, os animais eram fêmeas, com cerca de 21 dias de idade e faixa de peso entre 20 – 25 g, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB, UNICAMP, Campinas – SP, Brasil. Os animais ficaram retidos em caixas (máximo de cinco animais/caixa), em condições ponderadas de temperatura (23 ± 1 °C), umidade (55% ± 5%), iluminação automática (ciclo de 12/12 horas), água e ração *ad libitum*. O protocolo executado foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 28/2018).

**Experimento II.** Foram utilizados 42 camundongos BALB/c isogênicos, machos (N = 42), de, aproximadamente, 21 dias de idade e faixa de peso entre 18 – 21 g adquiridos junto ao CEMIB, UNICAMP, Campinas – SP, Brasil. Os animais foram mantidos em caixas (máximo de cinco animais/caixa), em condições ideais e controladas de temperatura ( $23 \pm 1$  °C), umidade ( $55\% \pm 5\%$ ), iluminação automática (ciclo de 12/12 horas), água e ração *ad libitum*. O modelo experimental empregado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 39/2014 e parecer 78/2015, adição de ensaio de xenodiagnóstico).

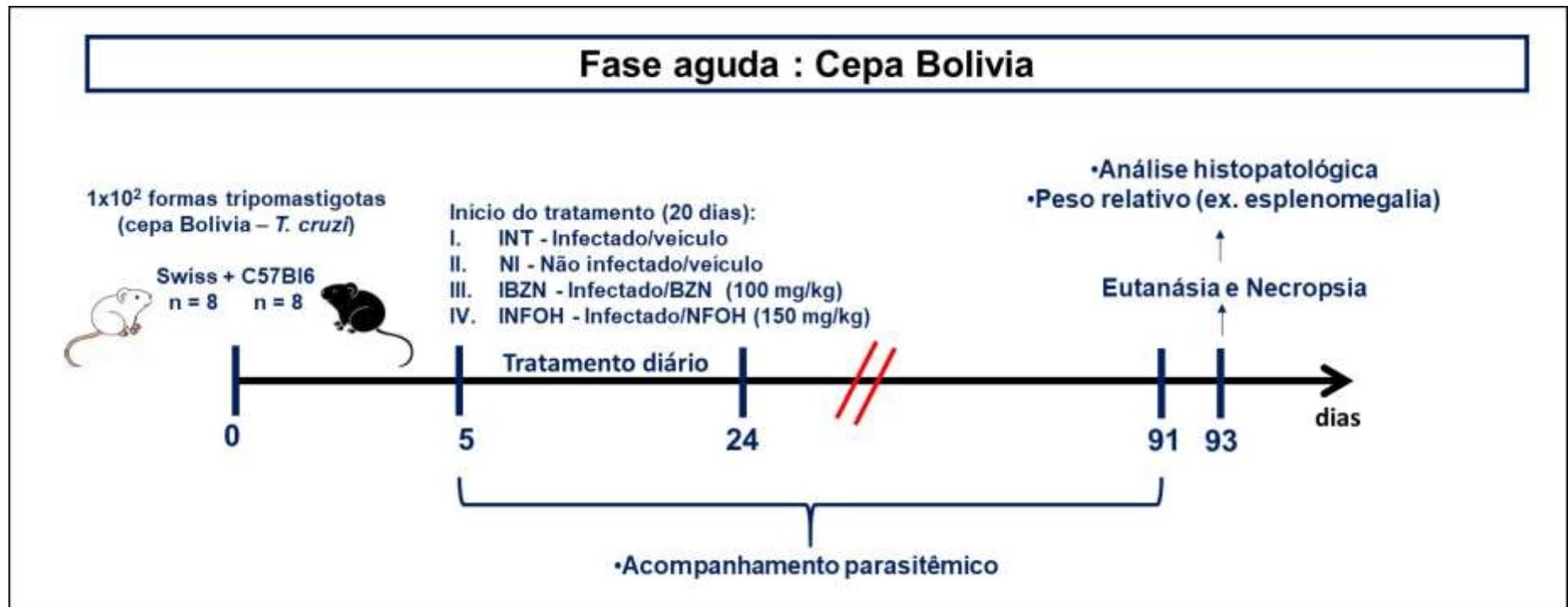
**Experimento III.** Utilizaram-se 22 camundongos BALB/c isogênicos, fêmeas (N = 22), aproximadamente 25 dias de idade e faixa de peso entre 20 – 25 g adquiridos junto ao biotério da “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” - *Department of Infection Biology* - UNIVERSITY OF LONDON. Os animais foram mantidos em caixas (grupos de três animais/caixa), em condições ideais e controladas de temperatura ( $24 \pm 1$  °C), umidade ( $55\% \pm 5\%$ ), iluminação automática (ciclo de 12/12 horas), água e ração *ad libitum*. O modelo experimental empregado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” - UNIVERSITY OF LONDON (Licença de projeto do UK Home Office - PPL 70/6997)

**Experimento IV.** Foram utilizados 22 camundongos BALB/c isogênicos, fêmeas (N = 22), aproximadamente 25 dias de idade e faixa de peso entre 20 – 25 g adquiridos junto ao biotério da “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” - UNIVERSITY OF LONDON. Os animais foram mantidos em caixas (grupos de três animais/caixa), em condições ideais e controladas de temperatura ( $24 \pm 1$  °C), umidade ( $55\% \pm 5\%$ ), iluminação automática (ciclo de 12/12 horas), água e ração *ad libitum*. O modelo experimental empregado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” - UNIVERSITY OF LONDON (Licença de projeto do UK Home Office - PPL 70/6997).

### 3.4.3. Delineamento e protocolos experimentais

**Experimento I.** Do total de camundongos (N = 30) para cada espécie de camundongo utilizada (Swiss e C57Bl6), 24 animais foram infectados (n = 8) e seis animais não foram infectados (n = 6). Os grupos dos animais infectados (n = 8) receberam as seguintes nomenclaturas: **INT** (controle positivo, infectado e tratado apenas com veículo – goma arábica 4%), **IBZN** (controle fármaco padrão, infectado e tratado com 100 mg/kg/dia de benznidazol), e **INFOH** (infectado e tratado com 150 mg/kg/dia de hidroximetilnitrofuril). O grupo não infectado (n = 6) foi nomeado como **NI** (grupo não infectado, tratado com veículo - goma arábica 4%). As doses utilizadas para ambos os compostos, bem como o veículo e número de animais, foram definidas de acordo com dados da literatura (DAVIES *et al.*, 2010, 2014; FRANCISCO *et al.*, 2015, 2016; SCARIM *et al.*, 2018)

Foram padronizadas e inculadas  $1 \times 10^2$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Bolívia) nos camundongos Swiss e C57Bl6. Após 5 dias pós-inóculo (5dpi), iniciou-se o tratamento por 20 dias. A parasitemia foi determinada em dias alternados a partir do 3dpi, até a negatificação da parasitemia por três dias alternados. Após 93dpi, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos (coração, músculos esquético, rins, fígado, baço e cólon) foram retirados e analisados (Figura 34).

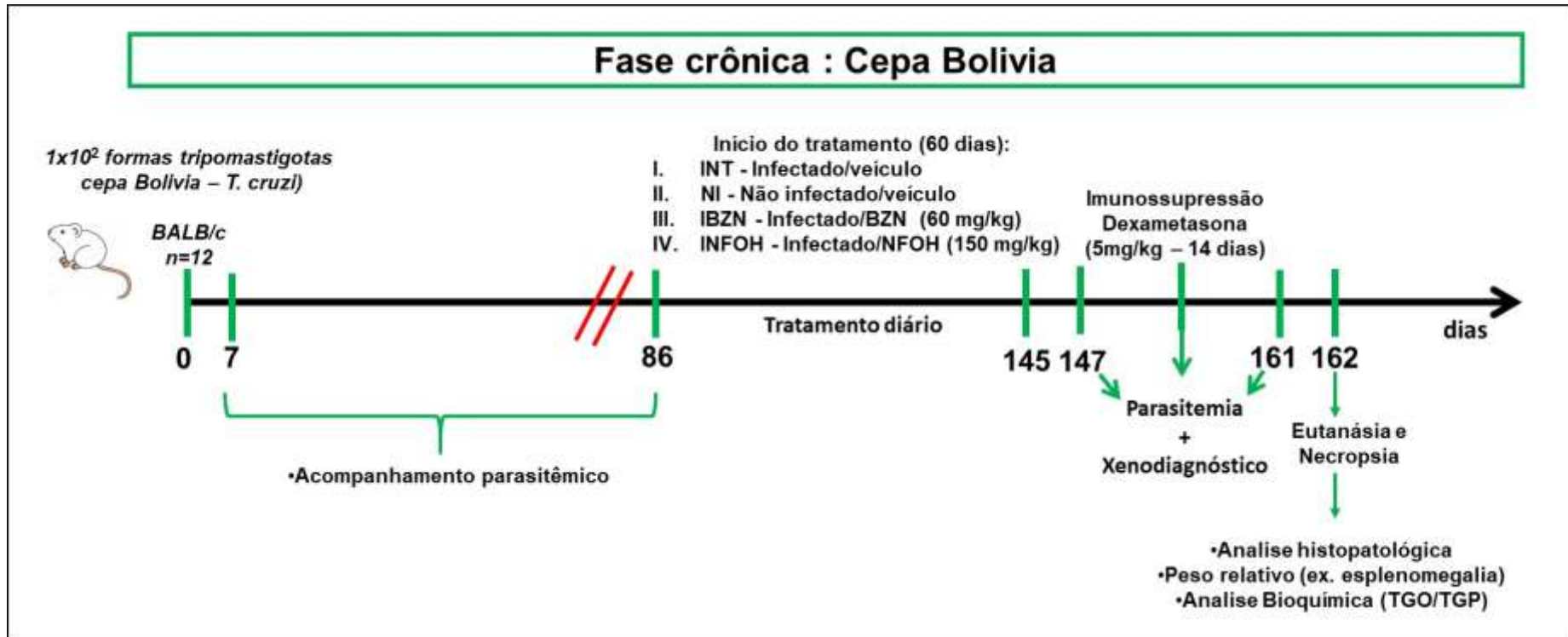


**Figura 34** - Protocolo do experimento I. Tratamento durante a fase aguda da doença de Chagas e acompanhamento parasitário até a fase crônica indeterminada, utilizando duas diferentes linhagens de camundongos: Swiss e C57Bl6 (cepa Bolívia de *T. cruzi*).  
Fonte: autor.

**Experimento II.** Do total de animais (N = 42), 36 camundongos foram infectados (n = 12) e seis animais não foram infectados (n = 6). Os grupos dos animais infectados (n = 12) receberam as seguintes nomenclaturas: **INT** (controle positivo, infectado e tratado apenas com veículo - goma arábica 4%), **IBZN** (controle fármaco padrão, infectado e tratado com 60 mg/kg/dia de benznidazol), e **INFOH** (infectado e tratado com 150 mg/kg/dia de hidroximetilnitrofurais). O grupo não infectado (n = 6), foi nomeado como **NI** (grupo não infectado, tratado com veículo - goma arábica 4%) (DAVIES *et al.*, 2010, 2014; SCARIM, 2016; SCARIM *et al.*, 2018). As concentrações empregadas para ambos os compostos, bem como o veículo e número de camundongos, foram determinadas de acordo com a literatura (DAVIES *et al.*, 2010, 2014; SCARIM *et al.*, 2018)

Foram inoculadas  $1 \times 10^2$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Bolívia) em camundongos Balb/c. A parasitemia foi determinada semanalmente, a partir do 7º dia após infecção, até a negatização por três dias alternados. Para esse experimento, a determinação da fase crônica da doença de Chagas, para o início do tratamento, no modelo apresentado (**II**), foi considerada após três ensaios de parasitemia negativa, confirmados em três dias alternados (fase crônica).

Dois dias após o término dos 60 dias consecutivos de tratamento, todos os animais foram submetidos à imunossupressão induzida pela administração de dexametasona (5 mg/kg/dia), por via intraperitoneal, durante 14 dias consecutivos (SCARIM, 2016. SCARIM *et al.*, 2018; PEREIRA, 2008). Nesse período de imunossupressão, acompanhou-se a presença de reativação parasitária por exames de parasitemia (método direto) e xenodiagnóstico (método indireto) no 1º, 7º e 14º dias do período de imunossupressão. Após 162dpi, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos (coração, músculos esquelético, rins, fígado, baço, cólon e cérebro) foram retirados e analisados (Figura 35).

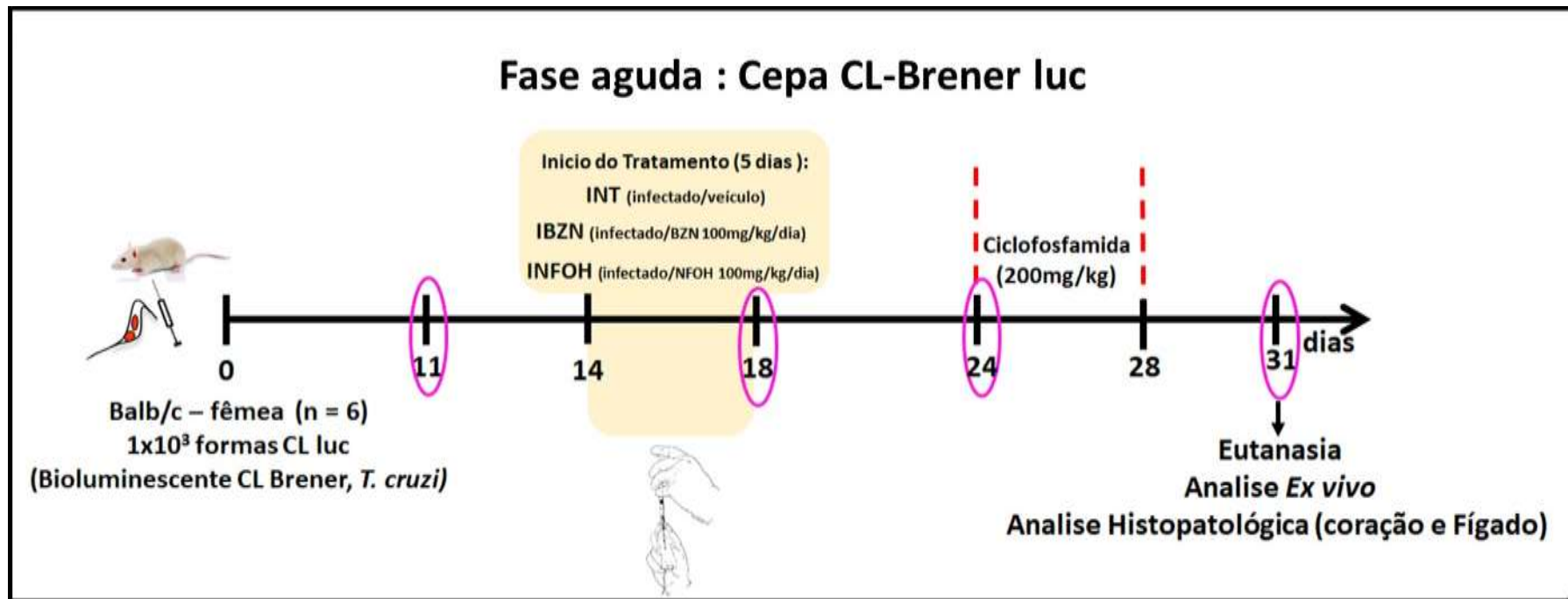


**Figura 35** - Protocolo prático do experimento II. Tratamento durante a fase crônica indeterminada da doença de Chagas, e acompanhamento parasitêmico até o dia 161 após infecção, utilizando linhagens de camundongos Balb/C (cepa Bolívia de *T. cruzi*).

Fonte: autor.

**Experimento III.** Do total de camundongos (N = 22), 18 animais foram infectados (n = 6) e quatro animais não foram infectados (n = 4). Os grupos dos animais infectados (n = 6) receberam as seguintes nomenclaturas: **INT** (controle positivo, infectado e tratado apenas com veículo), **IBZN** (controle fármaco padrão, infectado e tratado com 100 mg/kg/dia de benznidazol), e **INFOH** (infectado e tratado com 100 mg/kg/dia de hidroximetilnitrofurais). O grupo não infectado (n = 4), foi nomeado como **NI** (grupo não infectado, tratado com veículo). As doses utilizadas para ambos os compostos, bem como o veículo e número de animais, foram definidas de acordo com a padronização do experimento e dados da literatura (FRANCISCO *et al.*, 2015, 2016)

O protocolo experimental elaborado e efetuado, experimento **III**, está representado na figura a seguir (Figura 36), e foi baseado nos trabalhos de Francisco *et al.* (2015, 2016) e Lewis *et al.* (2014, 2015). Foram inoculados  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa CL Brener bioluminescente) inoculados nos camundongos Balb/c. Os animais foram mensurados quanto à parasitemia nos 11, 18, 23 e 31 dpi. Seis dias após o término dos cinco dias consecutivos de tratamento (14-18 dpi), todos os animais foram submetidos à imunossupressão induzida pela administração de duas doses de ciclofosfamida (200 mg/kg/dia), por via intraperitoneal, nos 24 e 28 dpi (FRANCISCO *et al.*, 2015, 2016). Após este período de imunossupressão, foi verificada a presença de reativação parasitária por exames de imagem no 31 dpi. Após 31 dpi, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos (coração e fígado) foram retirados e analisados histologicamente (Figura 36).

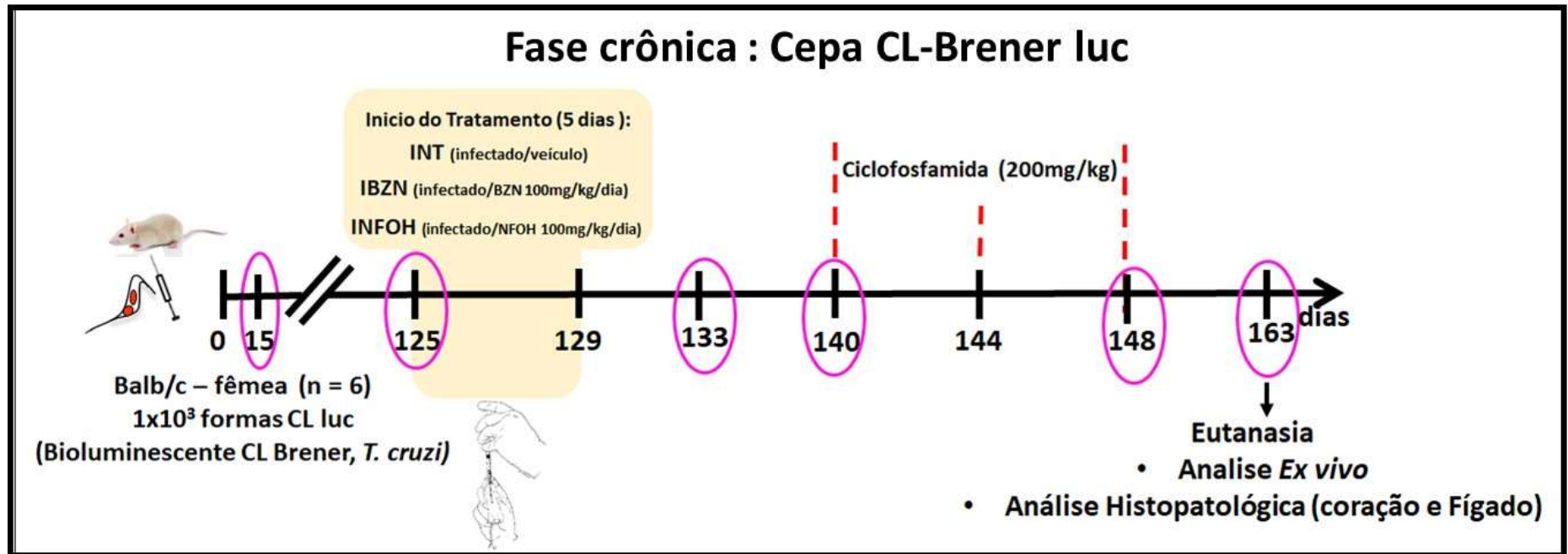


**Figura 36** - Protocolo prático do experimento III. Tratamento durante a fase aguda (14 – 18 dpi) da doença de Chagas; círculos em rosa são a análises parasitêmicas por meio de imagens nos 11, 18, 24 e 31 dpi (cepa CL Brener bioluminescente de *T. cruzi*); traços em vermelho são períodos de administração de ciclofosfamida, induzindo imunossupressão dos animais, nos 24 e 28 dpi.  
 Fonte: autor.



**Experimento IV.** Do total de animais (N = 22), 18 camundongos foram infectados (n = 6) e quatro animais não foram infectados (n = 4). Os grupos dos animais infectados (n = 6) receberam as seguintes nomenclaturas: **INT** (controle positivo, infectado e tratado apenas com veículo), **IBZN** (controle fármaco padrão, infectado e tratado com 100 mg/kg/dia de benznidazol), e **INFOH** (infectado e tratado com 100 mg/kg/dia de hidroximetilnitrofurais). O grupo não infectado (n = 4), foi nomeado como **NI** (grupo não infectado, tratado com veículo). As concentrações empregadas para ambos os compostos, bem como o veículo e número de animais, foram determinadas de acordo com a padronização do experimento e dados da literatura (FRANCISCO *et al.*, 2015, 2016)

O modelo experimental empregado, experimento **IV**, está simplificado no diagrama a seguir (Figura 37), o qual foi baseado nos estudos de Francisco *et al.* (2015, 2016) e Lewis *et al.* (2014, 2015). Foram inoculados  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa CL Brener luc bioluminescente) nos camundongos Balb/c. Os animais foram mensurados quanto à parasitemia nos 15, 125, 133, 140, 148 e 163 dpi. Após 11 dias do término dos cinco dias consecutivos de tratamento (125-129 dpi), todos os animais foram submetidos à imunossupressão induzida pela administração de três doses de ciclofosfamida (200 mg/kg/dia), por via intraperitoneal, nos 140, 144, 148 dpi (FRANCISCO *et al.*, 2015, 2016). Após este período de imunossupressão, foi verificada a presença de reativação parasitária por exames de imagem nos 148 e 163 dpi. Após 163 dpi, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos (coração e fígado) foram retirados e analisados histologicamente (Figura 37).



**Figura 37** - Protocolo prático do experimento IV. Tratamento durante a fase crônica (125 – 129 dpi) da doença de Chagas; círculos em rosa são a análises parasitêmicas por meio de imagens nos 15, 125, 133, 140, 148 e 163 dpi (cepa CL Brener bioluminescente de *T. cruzi*); traços em vermelho são períodos de administração de ciclofosfamida, induzindo imunossupressão dos animais, nos 140, 144 e 148 dpi.

Fonte: autor.

### 3.4.3. Método de monitoramento parasitêmico

Para os experimentos I e II, a contagem para a avaliação das formas tripomastigotas da cepa Bolívia (*T. cruzi*) foi realizada de acordo com o método de Brener, 1962 (BELDA NETO, 1973; ANDRADE, 1974). O sangue da cauda dos camundongos foi coletado utilizando micropipeta de 5  $\mu$ L em uma incisão realizada com lâmina estéril. O sangue foi colocado sobre a lâmina de vidro de 26 x 76 mm e coberto por lamínula de 22 x 22 mm, de modo a formar uma camada delgada e homogênea de sangue em toda a extensão da lamínula (MARTINS, 1999).

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico Carl Zeiss JENA-JENAVAL, com objetiva de 40X e ocular de 10X. Foram analisados 20 campos microscópicos nos quatro cantos da amostra, adicionalmente, mais 20 campos na parte central, totalizando 100 campos microscópicos investigados. Considerando que a superfície da lamínula utilizada com a correção dos intercampos corresponde, no aumento empregado, a cerca de 1555 campos microscópicos, basta multiplicar o número de flagelados encontrado no exame de 100 campos pelo fator 15,55 e obtém-se o número de formas tripomastigotas presentes em 5  $\mu$ L (MARTINS, 1999).

Os camundongos Swiss, C57Bl6 e Balb/c, em ambos os experimentos (I e II), receberam, via i.p., inóculos contendo  $1 \times 10^2$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Bolívia), em 0,3 mL de sangue diluído. Para tanto, utilizamos seringa de vidro tipo tuberculina e agulha BD 10x5 para indução da doença de Chagas (BUSTAMANTE *et al.*, 2007; MOLINA BERRIOS *et al.*, 2013; SCARIM, 2016; SCARIM *et al.*, 2018).

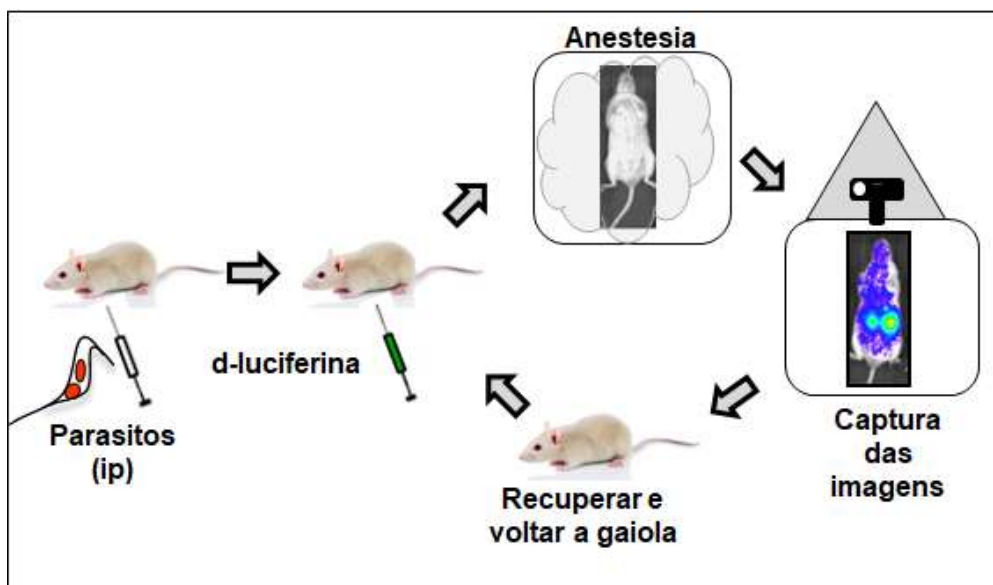
As fases da parasitêmia foram classificadas como período pré-patente, patente e pico máximo de parasitêmia, de acordo com Andrade (1974), Francisco (2007), Ribeiro (2010) e Scarim *et al.* (2018).

- pré-patente: corresponde ao período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia de detecção do parasito no sangue periférico do animal.
- patente: período compreendido entre o primeiro dia de exame a fresco positivo até a completa ausência de formas tripomastigostas no sangue (fase aguda).
- Pico máximo de parasitêmia: correspondente à quantidade máxima de parasitos no sangue e expresso em número de tripomastigostas sanguíneos / 5  $\mu$ L de sangue.

Visto que o xenodiagnóstico é um exame parasitológico indireto, aplicado à forma crônica da doença, este ensaio que registra a presença ou ausência do parasito no sangue do hospedeiro vertebrado. Este ensaio foi realizado apenas nos animais do experimento **II** (Balb/c), durante o tratamento de imunossupressão, no 1º, 7º e 14º dias da fase de imunossupressão.

Utilizaram-se três diferentes espécies de ninfas, sendo três ninfas de cada espécie por animal. Portanto cada animal recebeu nove ninfas para cada xenodiagnóstico. As seguintes espécies foram utilizadas como vetores no ensaio indireto de xenodiagnóstico (apenas no experimento **II**): *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*. Após 45 dias do xenodiagnóstico, foram examinadas as fezes dos vetores para investigação de formas livres de *T. cruzi*, que indicaram infecção ou ausência de infecção dos animais (PORTELA-LINDOSO *et al.*, 2003; FRANCO *et al.*, 2002; BORGES-PEREIRA *et al.*, 1996). Esta análise foi realizada no Departamento de Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, com a colaboração do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

A leitura da parasitêmia dos experimentos **III** e **IV** foi observada utilizando-se o procedimento para experimentos por imagens (Figura 38).  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de CL Brener bioluminescente diluídas em 0,2 mL de PBS foram primeiramente inoculadas em camundongos via i.p. No pico da parasitêmia, cerca de 11dpi, foram realizadas diluições de 3  $\mu$ L de sangue em 27  $\mu$ L de tampão para lise celular dos glóbulos vermelhos e contagem usando um hemocitômetro. Em dias específicos, os animais foram inoculados com  $150 \text{ mg/kg}^{-1}$  d-luciferina, anestesiados e fotografados de dois (fase aguda) até cinco minutos (fase crônica), utilizando equipamento de captura de imagem *IVIS Lumina II system* (Caliper Life Science) (Figura 38).



**Figura 38** - Procedimento padrão para experimentos de imagem *in vivo*.

Fonte: autor.

#### 3.4.4. Taxa de mortalidade

Os animais foram monitorados diariamente desde o período do inóculo parasitário (0 dpi) até o dia da eutanásia, realizada 91 dpi no experimento **I** (Swiss e C57Bl6), 161 dpi para experimento **II** (Balb/c), 31 dpi para o experimento **III** (Balb/c), 163 dpi para o experimento **IV** (Balb/c). Desta maneira, a taxa de mortalidade registrada foi expressa em porcentagem cumulativa.

#### 3.4.5. Necropsia dos animais utilizados

Nos experimentos **I** e **II**, os animais foram eutanasiados por meio de saturação de CO<sub>2</sub> realizada 91 dpi no experimento **I** e 161 dpi para experimento **II**. Para os experimentos **III** e **IV**, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo realizados no dia 31 e 163 dpi, respectivamente. Além disso, os animais foram avaliados quanto à presença de ectoparasitas, escoriações, escaras, cicatrizes, presença de neoplasias, alterações relacionadas ao estado nutricional do animal, bem como a situação das mucosas (oral, ocular, vaginal, peniana e anal). Os experimentos de fase aguda, **I** e **III**, foram eutanasiados em dias diferentes (91 e 31 dpi, respectivamente), uma vez que o experimento **III** possui técnicas mais aprimoradas e específica para definir a cura estéril dos animais, o que não foi

possível ser aplicado no experimento I, que por sua vez, foi acompanhado por um período maior, a fim de verificar e monitorar a atividade de NFOH após o tratamento agudo. E sendo complementado pela análise histopatológica. Para os experimentos crônicos, II e IV, o período foi semelhante, para, experimentalmente, certificar o estágio crônico da doença de Chagas.

Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito dorsal com os membros devidamente presos. Após assepsia peritoneal com álcool 70% foi realizada uma incisão mentopubiana superficial nos mesmos, para a retirada (necropsia) dos órgãos a serem examinados já descritos anteriormente, e conseqüentemente fixados em formaldeído tamponado a 10% (pH = 7.2), por cerca de 24 horas, e transferidos para álcool 70% para posterior processamento rotineiro e análise histopatológica.

#### **3.4.6. Análise Macroscópica**

Em razão da alta hiperplasia celular estimulada, principalmente, no estágio crônico da doença de Chagas, diferentes órgãos e tecidos podem ter seu volume alterado em razão de uma discrepância na pressão sanguínea, alterando o sistema hemodinâmico e/ou pela alteração e destruição do plexo mioentérico. Órgãos como coração, cólon e esôfago, podem aumentar ou não de volume, bem como órgãos secundários, como por exemplo baço, fígado, rins, bexiga e vesícula biliar (JELICKS; TANOWISZ, 2011; PAIVA *et al.*, 2011). Assim, foi realizada a análise macroscópica, bem como o peso relativo (a seguir) dos órgãos.

Nos experimentos I e II, foram realizadas análises macroscópicas dos órgãos, identificando os valores para o comprimento, largura e altura (em anexos), bem como eventuais danos teciduais, como mencionado anteriormente. A análise macroscópica foi realizada apenas para os experimentos I e II.

#### **3.4.7. Peso relativo**

##### **3.4.7.1. Peso relativo corpóreo**

O peso dos animais foi semanalmente aferido em balança analítica nos experimentos **I** e **II**, e durante as análises parasitêmicas por imagens nos experimentos **III** e **IV**. Posteriormente, o peso relativo semanal dos animais foi estimado. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de ganho ou perda de peso corpóreo. Estes valores são calculados como segue:

$$\text{Peso relativo corpóreo (\%)} = \text{peso da semana (g)} \times 100 / \text{peso inicial (g)} - 100$$

#### **3.4.7.2. Peso relativo dos órgãos**

O peso relativo dos órgãos foi exibido apenas para os experimentos **I** e **II**. Os órgãos desejados em cada experimento, **I** e **II**, foram pesados em balança analítica após a eutanásia dos animais, para que fosse calculado o peso relativo de cada órgão em questão, expressos em porcentagem (%). Estes valores são calculados como segue:

$$\text{Peso relativo dos órgãos (\%)} = \text{peso órgão (g)} / \text{peso final animal (g)} \times 100$$

#### **3.4.8. Análise *ex vivo* por imagem**

Nos experimentos **III** e **IV** os animais foram submetidos a análises *ex vivo*, por imagem, dos órgãos e corpo (como um todo), para confirmação completa de cura ou não. Esse procedimento foi realizado apenas para animais que se apresentaram negativos na parasitêmia por imagem (sem infecção, normal), entretanto, para exemplificar a análise e ilustrá-la, durante o experimento **III** foram escolhidos os animais 1 e 6 de cada grupo para análise *ex vivo*, e no experimento **IV** o grupo **INT** foi escolhido o camundongo 5 como exemplo (escolha aleatória), para os demais grupos todos os animais com parasitêmia negativa foram submetidos a análise *ex vivo*.

#### **3.4.9. Estudo histopatológico**

O processo completo para análise histopatológica dos experimentos **I** e **II** foi executado no Laboratório de Estomatopatologia, Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/SP (UNESP), com a

colaboração do Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade. Para os experimentos **III** e **IV**, o processamento das peças foi realizado no laboratório de histopatologia da “*London School of Hygiene and Tropical Medicine*” - UNIVERSITY OF LONDON com a colaboração da Dr. Amanda Fortes Francisco e do Prof. Dr. John M. Kelly.

Os órgãos observados em cada experimento, **I - IV**, foram retirados após a eutanásia dos animais e, em seguida, foram executados, em cada órgão, cortes transversais de aproximadamente 3 mm e, posteriormente, preservados em solução de formalina a 10% tamponada (pH = 7,2) por um período de 24 horas. Após esse intervalo, os órgãos em questão foram transferidos para álcool 70% até o processamento histológico padrão.

#### **3.4.9.1. Registro das amostras e cortes histológicos seriados**

Em todos os experimentos realizados neste trabalho (**I – IV**), os órgãos retirados foram seccionados em cortes de 3 mm de modo a fornecer uma análise mais completa das regiões dos tecidos. Em seguida, os fragmentos foram inseridos em cassetes para processamento histopatológico devidamente codificados para preservar a identidade de cada animal, bem como seu grupo, durante a análise histopatológica (avaliador cego).

#### **3.4.9.2. Processo de desidratação e parafinização**

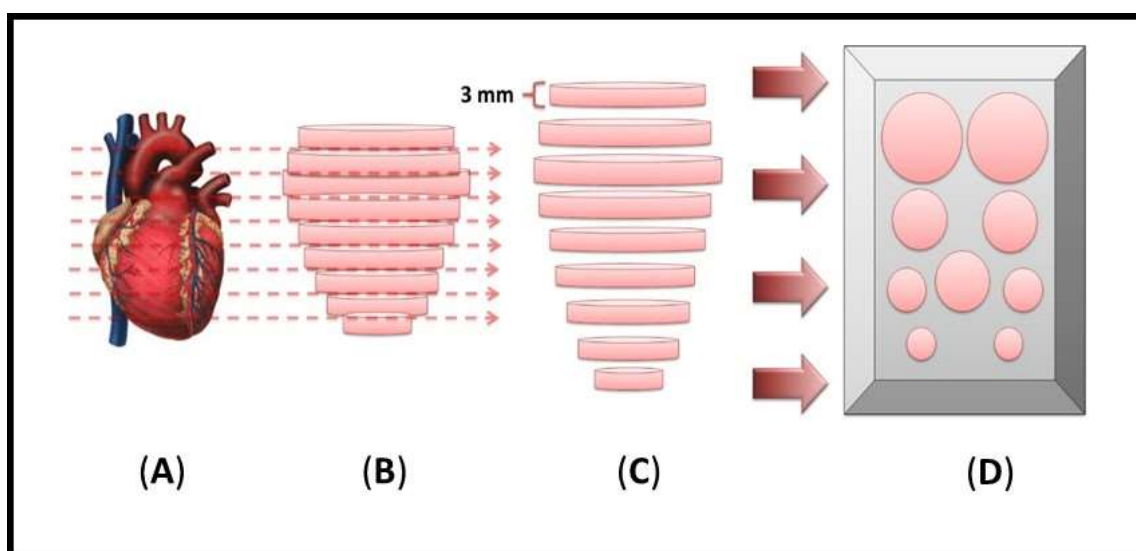
O processamento histológico envolve a desidratação, utilizando concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e três trocas de álcool absoluto), diafanização por duas posteriores substituições por xilol e, finalmente, embebição e inclusão em parafina líquida.

#### **3.4.9.3. Cortes histológicos – micrótomo**

Os órgãos foram adequadamente emblocados em parafina e individualmente submetidos a microtomia com cortes histopatológicos com espessura de 3 µm. Posteriormente, foram preparadas duas lâminas histopatológicas para cada órgão (coração, músculo esquelético, rim, fígado, baço, colon e cérebro), acondicionando-

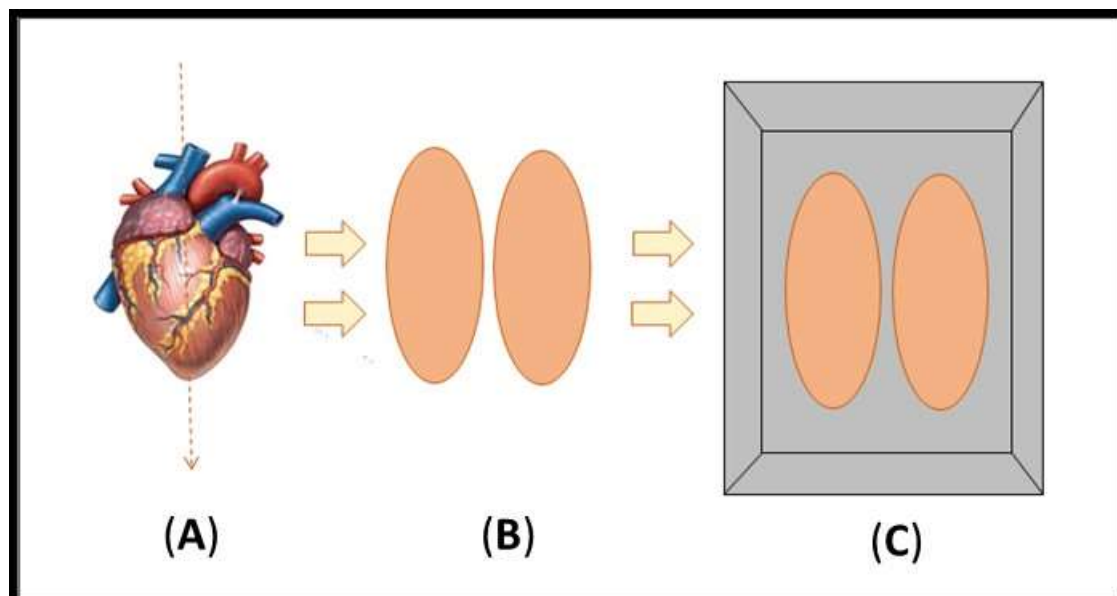


em estufa a 60 °C por 12 horas a fim de eliminar o excesso de parafina presente na lâmina. Todos os órgãos dos experimentos (I e II), foram integralmente analisados, pois os órgãos foram seccionados a cada 3 mm (Figura 39). Para os experimentos III e IV, foram realizados cortes sagitais medianos nos tecidos cardíacos e hepáticos para análise de infiltrados inflamatórios e presença de fibrose (Figura 40). As técnicas utilizadas para os cortes histopatológicos foram diferentes entre os experimentos I-II e III-IV, uma vez que para os experimentos I-II, foi necessária uma análise mais minuciosa para identificar a presença de ninhos amastigotas de *T. cruzi* durante as análises histopatológicas. Para os experimentos III-IV, a análise histopatológica complementou os resultados obtidos com a técnica de bioluminescência, a mais aprimorada tecnologia, até o momento, para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos.



**Figure 39** – Representação esquemática dos cortes seriados realizados nos experimentos I e II. (A): representação anatômica. (B): órgão representativo (exemplo: coração). (C): seção e cortes histopatológicos seriados (3 mm). (D): cortes já inclusos em parafina no cassete. Todos os órgãos citados pelo autor receberam cortes histopatológicos transversais e seriados.

Fonte: extraído e adaptado de SCARIM, 2016.



**Figure 40** - Representação esquemática do processamento realizado nos experimentos **III** e **IV**. **(A)**: representação anatômica. **(B)**: órgão representativo e cortes histopatológicos (exemplo: coração). **(C)**: cortes já inclusos em parafina no cassete. Todos os órgãos citados pelo autor receberam cortes histopatológicos sargitais medianos.

Fonte: extraído e adaptado de SCARIM, 2016.

#### 3.4.9.4. Coloração histopatológica

As lâminas obtidas para a análise histopatológica dos experimentos **I** e **II** foram previamente coradas com hematoxilina e eosina. O processo de coloração envolve a remoção do excesso de parafina por meio do xilol, reidratações em álcoois (concentrações decrescentes), hematoxilina seguido de eosina, e, posteriormente, desidratação em álcoois (concentrações crescentes), até retornar ao banho de xilol. Por fim, as lâminas coradas foram montadas utilizando Permount<sup>(R)</sup> (experimentos **I** e **II**) e HistoChoice<sup>(R)</sup> (experimentos **III** e **IV**) para fixação de lamínulas de vidro na própria lâmina.

As colorações utilizadas para a análise histopatológica do coração e fígado, experimentos **III** e **IV**, foram de hematoxilina e eosina e Picrosirius-Red. O primeiro é responsável pela observação de infiltrados inflamatórios nos tecidos e o segundo, para averiguação de redes de fibrina nos tecidos (visualização de colágeno).

### 3.4.9.5. Análises histopatológicas

Todos os órgãos e tecidos avaliados nos experimentos **I** e **II**, foram analisados quanto à presença e quantidade de ninhos amastigotas de *T. cruzi*. As análises foram realizadas em objetivas de 10x, 20x e, principalmente, 40x executadas em todos os cortes. Não menos importante, a presença e quantificação de infiltrados inflamatórios foi observada, considerando **intensidade** (leve (1), moderado (2) e forte (3) e **tipo** (agudo(1), crônico (2) e misto (3)). Também, foi verificada a presença de áreas de necrose, hemorragia e calcificação distrófica dos tecidos analisados. Seguindo parâmetros de análises da literatura, as propriedades específicas de cada órgão avaliado foram abordadas e relatadas, conforme descrito por Scarim (2016).

Portanto, para os experimentos **I** e **II**, foi determinado como um “score”, uma escala semiquantitativa que variou de zero (-) a três (+++), usada para quantificar ou caracterizar a intensidade nas características morfológicas analisadas, como o processo inflamatório, calcificação distrófica, necrose e ninhos amastigotas. O "zero" (-) foi considerado como a ausência de inflamação, calcificação, necrose e ninhos amastigotas; (+) inflamação leve, calcificação leve, necrose leve e raros ninhos amastigotas. (++) inflamação moderada, calcificação moderada, necrose moderada e moderada presença de ninhos amastigotas; (+++) inflamação intensa, calcificação intensa, necrose intensa e acentuada presença de ninhos amastigotas. Portanto, a ordem crescente, padronizada, para codificação dos resultados e graus histopatológicos dos experimentos **I** e **II** são: leve < moderado < intenso.

Além disso, vale realçar que para os resultados histopatológicos observados nos experimentos **I** e **II**, foi realizado o teste de concordância entre analisadores, conhecido como índice *kappa* (*k*), que estabelece um avanço em relação à taxa geral de concordância, uma vez que determinada medida for frequentemente semelhante entre os analisadores o índice é positivo. Quando houve discrepância entre os dados obtidos por meio de inter-observadores, foi realizada uma terceira análise, mais detalhada, para que então chegue a um resultado confiável (GALPARSORO; FERNÁNDEZ, 1999)

Para as análises dos experimentos **III** e **VI**, os tecidos analisados foram quantificados em 15 imagens aleatórias. Essas imagens foram observadas em objetiva de 40x e, conseqüentemente, digitalizadas por meio de uma microcâmera Leica DM5000B e do programa “Leica Application Suite (versão 2.4.1 R1). As

análises das imagens obtidas foram realizadas através do programa Leica KWin V3, e os valores para os achados inflamatórios foram expressos em número de células/ $6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  e para colágeno expresso em colágeno total / $6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ .

### 3.4.10. Análise bioquímica TGO e TGP

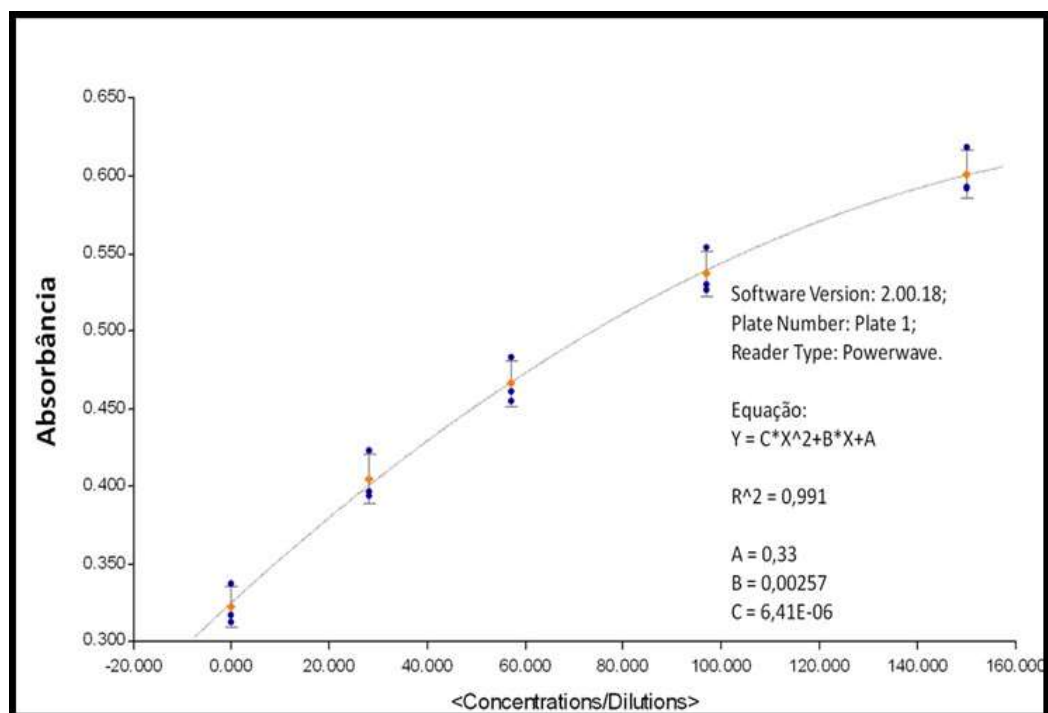
Particularmente para o experimento II, a completa interpretação dos dados obtidos de valores expressados por absorvâncias no espectrofotômetro foi substancial a construção de curvas de calibração, de execução fácil e compreensível, uma vez que seus valores de referências estão especificados nos manuais de referência do kit bioquímico Labtest®. Durante a constatação dos valores de referência, é preciso realizar a conversão de absorvância em unidades de atividade enzimática por litro de sangue (U/L). Ambos os ensaios bioquímicos, TGO e TGP, foram realizados em triplicatas, para os valores de absorvâncias, que originaram as curvas nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** - Valores de absorvância, em triplicata, para confecção de curva de calibração para TGO (U/L).

<i>Valor de referência (U/L)</i>	<i>TGO</i>				
	<i>0</i>	<i>24</i>	<i>61</i>	<i>114</i>	<i>160</i>
<i>Abs 1</i>	<i>317</i>	<i>409</i>	<i>484</i>	<i>542</i>	<i>596</i>
<i>Abs 2</i>	<i>318</i>	<i>395</i>	<i>468</i>	<i>519</i>	<i>593</i>
<i>Abs 3</i>	<i>327</i>	<i>388</i>	<i>464</i>	<i>522</i>	<i>582</i>
<i>Média</i>	<i>320</i>	<i>397</i>	<i>472</i>	<i>527</i>	<i>591</i>
<i>Desvio Padrão</i>	<i>0,005</i>	<i>0,010</i>	<i>0,010</i>	<i>0,012</i>	<i>0,006</i>

Fonte: dados da pesquisa.

Com as medidas de absorvância estabelecidas, e tomando os valores de referência correspondentes, construímos a curva de calibração para a enzima TGO (Figura 41) utilizando o software OriginPro®:



**Figura 41** - Curva de calibração para a enzima TGO (U/L).

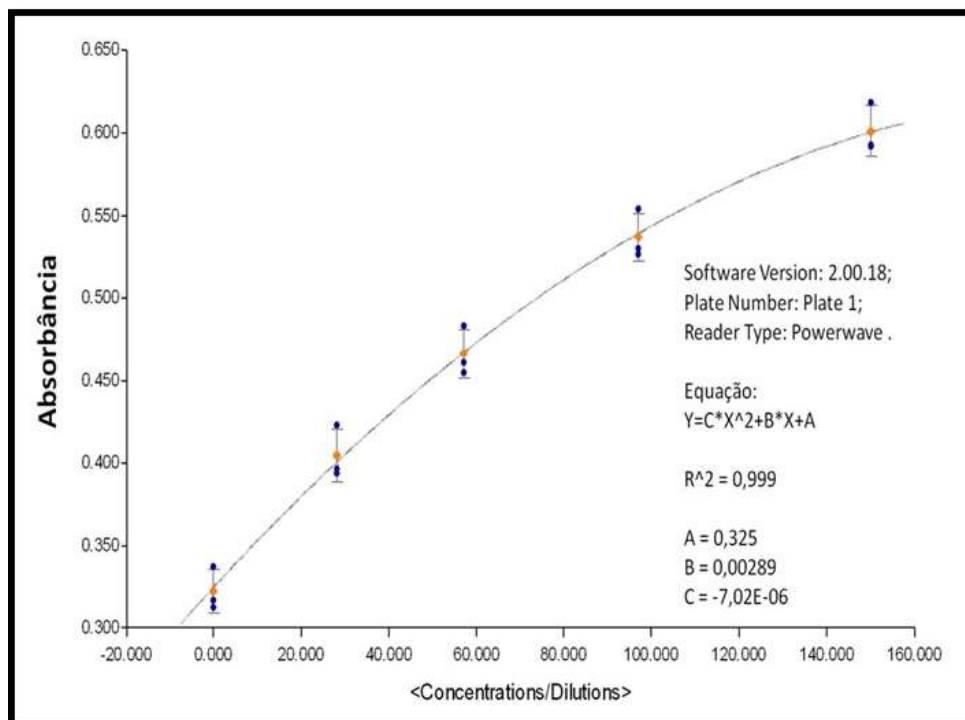
Fonte: autor.

**Tabela 2** - Valores de absorbância, em triplicata, para confecção de curva de calibração para TGP (U/L).

<b>TGP</b>					
<b>Valor de referência (U/L)</b>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>57</b>	<b>97</b>	<b>150</b>
<b>Abs 1</b>	338	423	483	554	619
<b>Abs 2</b>	317	397	461	53	592
<b>Abs 3</b>	313	394	455	527	593
<b>Média</b>	322	404	466	537	601
<b>Desvio Padrão</b>	0,013	0,015	0,014	0,014	0,015

Fonte: dados da pesquisa.

Utilizando os valores de referência estabelecidos para essa enzima, e tendo em mãos as medidas de absorbância, construímos também a curva de calibração para a enzima TGP (Figura 42) utilizando o software OriginPro®:



**Figura 42** - Curva de calibração para a enzima TGP (U/L).

Fonte: autor.

### 3.4.11. Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 6.01 aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância a 5% ( $p < 0,05$ ), através de comparações múltiplas dos grupos pelo teste T. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 4. Resultados

### 4.1. Ensaios *in vivo*

Os experimentos realizados estão sumarizados na Tabela 3..

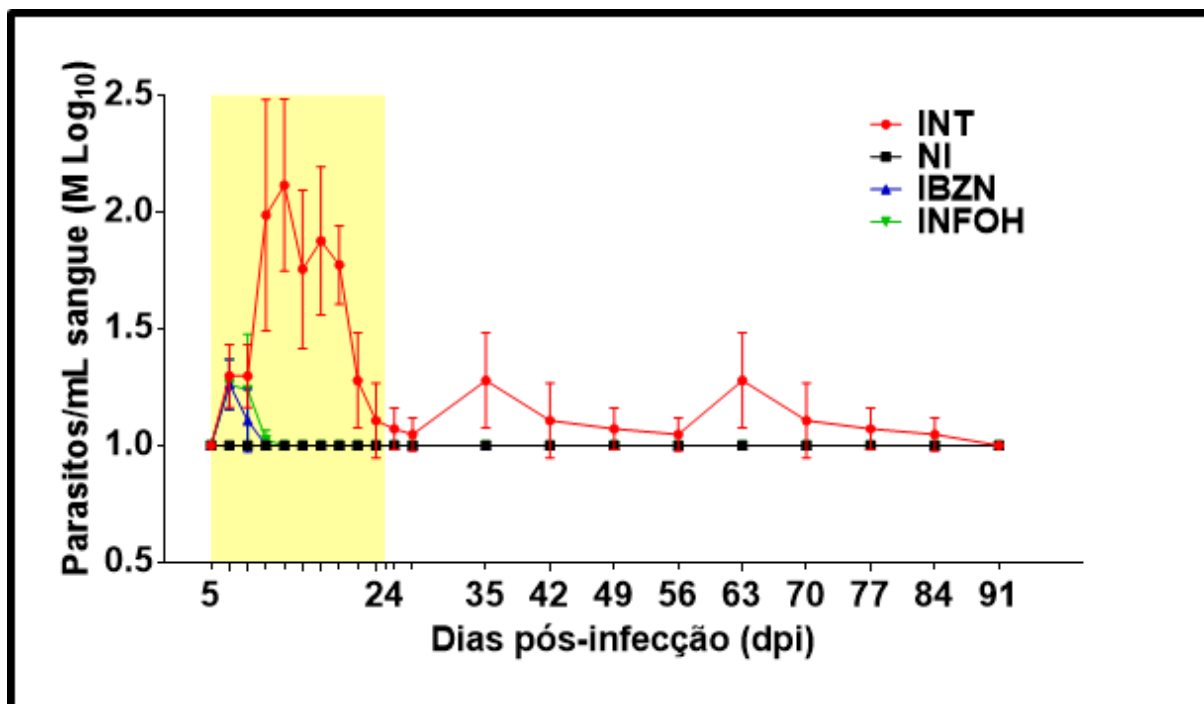
**Tabela 3** - Resumo dos ensaios realizados em cada um dos quatro experimentos. (\*) agudo, cepa Bolívia; (&) crônico, cepa Bolívia; (#) agudo, cepa Brener CL bioluminescente; (α) crônico, cepa CL-Brener luc bioluminescente.

Métodos avaliados	Experimento I*	Experimento II&	Experimento III#	Experimento VI <sup>α</sup>
Cepa Bolívia	✓	✓	-	-
Cepa CL Brener bioluminescente	-	-	✓	✓
Parasitemia	✓	✓	✓	✓
Imunossupressão (parasitemia – método direto)	-	✓	✓	✓
Imunossupressão (parasitemia – método indireto: xenodiagnóstico)	-	✓	-	-
Análise <i>Ex vivo</i>	-	-	✓	✓
Peso relativo corpóreo	✓	✓	✓	✓
Peso relativo órgãos	✓	✓	-	-
Análise macroscópica	✓	✓	-	-
Análise bioquímica – TGO/TGP	-	✓	-	-
Análise histopatológica	✓	✓	✓	✓

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.1.1. EXPERIMENTO I

O acompanhamento da parasitemia do ensaio de fase aguda com cepa Bolívia está apresentado na Figura 43.



**Figura 43** - Média e desvio padrão dos níveis parasitêmicos observados em cada grupo de camundongos Swiss inoculados com  $1 \times 10^2$  formas da cepa Bolívia de *T. cruzi* – Experimento I. Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (20 dias).

Fonte: dados da pesquisa.

O período pré-patente foi de cinco dias conforme descrito na literatura, e o pico parasitêmico foi de 11-13 dpi para o grupo **INT**, enquanto que para **IBZN** e **INFOH**, o pico parasitêmico caiu para 7dpi. Não houve óbito de animais neste modelo e a fase aguda permaneceu por cerca de 91dpi no grupo **INT**, antecipando 11 e 13 dpi para os grupos **IBZN** e **INFOH**, respectivamente (Tabela 4).

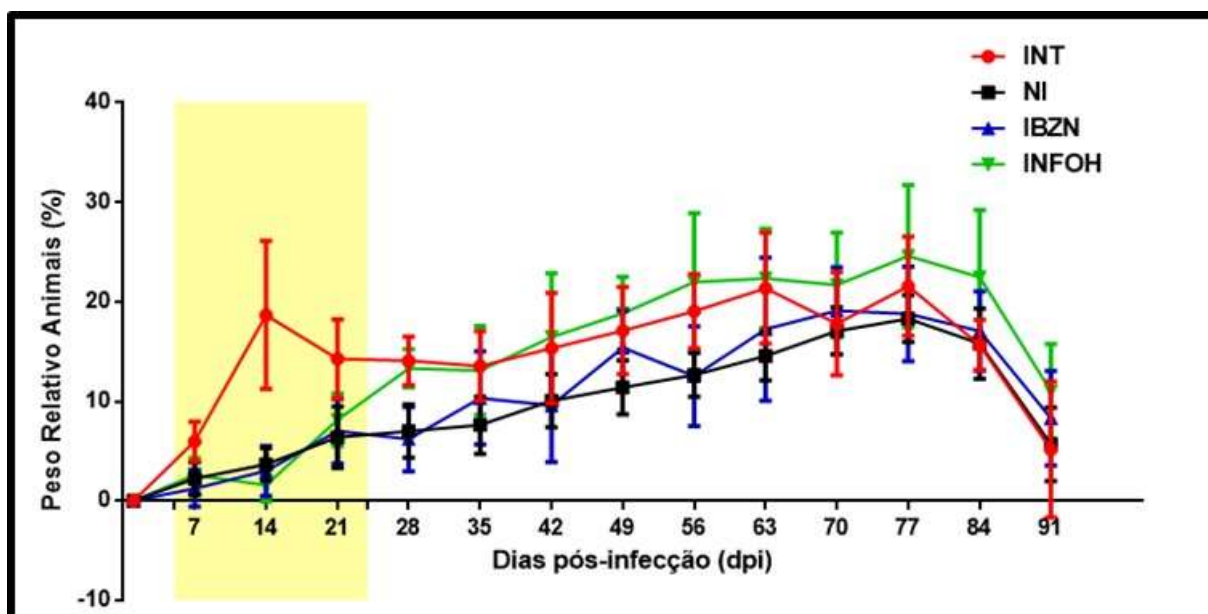


**Tabela 4** - Resultados do acompanhamento parasitêmico e da taxa de mortalidade durante o experimento I – Swiss (cepa Bolívia de *T. cruzi*).

Grupos	% de infecção	Taxa de mortalidade	Período pré-patente	Pico parasitêmico	Duração da fase aguda
<b>NI</b>	0	0	0	0	0
<b>INT</b>	100%	0	5dpi	11-13dpi	91dpi
<b>IBZN</b>	100%	0	5dpi	7dpi	11dpi
<b>INFOH</b>	100%	0	5dpi	7dpi	13dpi

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados em relação ao peso relativo dos animais, no experimento I, com camundongos Swiss, observados ao longo de 91 dias, pesados semanalmente, estão apresentados na Figura 44. Os resultados apontam que houve diferença estatística apenas no 14dpi, onde o grupo **INT** mostrou ganho de peso superior aos demais grupos. No 28dpi os grupos **INT** e **INFOH** mostram ser estatisticamente diferentes em relação aos grupos **IN** e **IBZN**, sendo que após este dia, todas as semanas mostraram similaridade entre todos os grupos estudados.



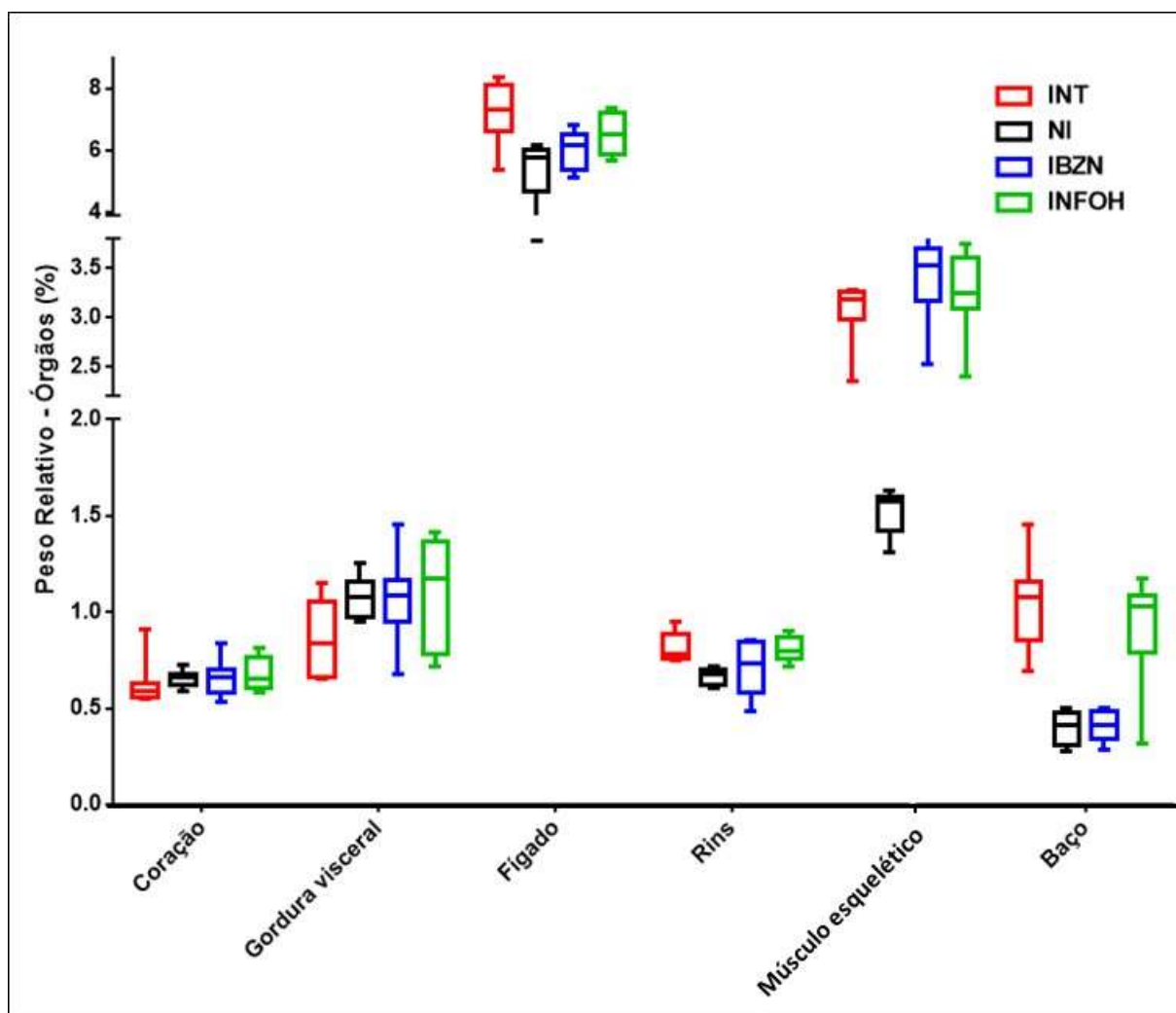
**Figura 44** - Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Swiss infectados com  $10^2$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia de *T. cruzi* (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), e grupo não infectado (**NI**).  
Fonte: dados da pesquisa.

Em relação ao peso relativo do coração, para o experimento I (swiss), não foi estatisticamente diferente para os grupos estudados (Figura 45). Quanto ao peso relativo da gordura visceral, foi similar ao peso relativo cardíaco, sendo que não houve diferença estatística entre os grupos, apesar do grupo **INFOH** possuir a maior variação (Figura 45).

No peso relativo do fígado, todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) mostraram hepatomegalia quando comparados ao grupo **NI** (**INT**,  $p = 0,0345$ ; **IBZN**,  $p = 0,0429$ ; **INFOH**,  $p = 0,0108$ ) (Figura 45). Além disso, foi observado diferença estatística no peso relativo hepático de **INT** e **IBZN** ( $p = 0,0023$ ), sendo **IBZN** com hepatomegalia em relação ao **INT**. Não houve diferença entre os grupos infectados e tratados (**IBZN** e **INFOH**). Quanto aos rins, os resultados demonstram que não houve diferença estatística entre os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**). No entanto, o grupo sem infecção (**NI**), apresentou o peso relativo renal menor e estatisticamente diferente em relação aos grupos **INT** ( $p = 0,0164$ ) e **INFOH** ( $p = 0,0002$ ). Os músculos esqueléticos dos animais também foram mensurados e, por consequência, expressados seus pesos relativos. Os resultados apontam diferença significativa entre os grupos infectados (**INT**,  $p < 0,0001$ ; **IBZN**,  $p = 0,0001$ ; **INFOH**,  $p$

= 0,0001) e o grupo não infectado (**NI**), sendo este último (**NI**) com menor peso relativo do músculo esquelético em relação aos demais.

Os dois grupos infectados **INT** e **INFOH** apresentaram esplenomegalia quando comparados ao grupo **NI** (**INT**,  $p = 0,0008$ ; **INFOH**,  $p = 0,0002$ ). Foi observado diferença estatística entre o peso relativo esplênico dos grupos infectados e tratados, **IBZN** e **INFOH** ( $p = 0,0014$ ). O grupo **IBZN** aponta diminuição do volume esplênico, provavelmente devido à pequena diminuição dos níveis parasitêmicos durante o tratamento, o que não foi observado no grupo tratado com **INFOH**. O peso relativo dos cólons obtidos para análise histopatológica não foi considerado, uma vez que pode haver variantes entre os animais devido à presença ou ausência de fezes, podendo então comprometer os valores nos resultados finais.

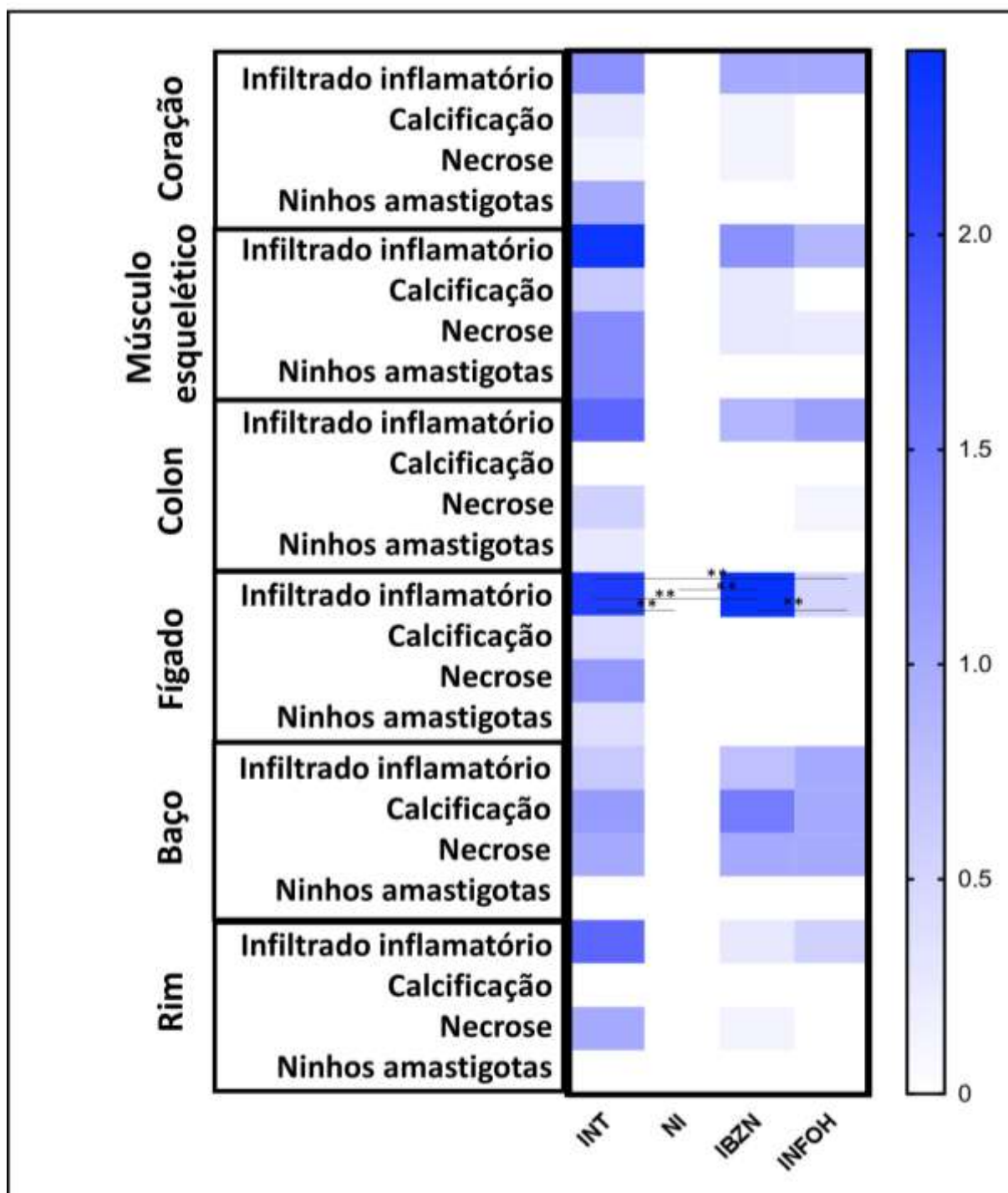


**Figura 45** - Peso relativo dos órgãos dos camundongos Swiss (experimento I).

Fonte: dados da pesquisa.

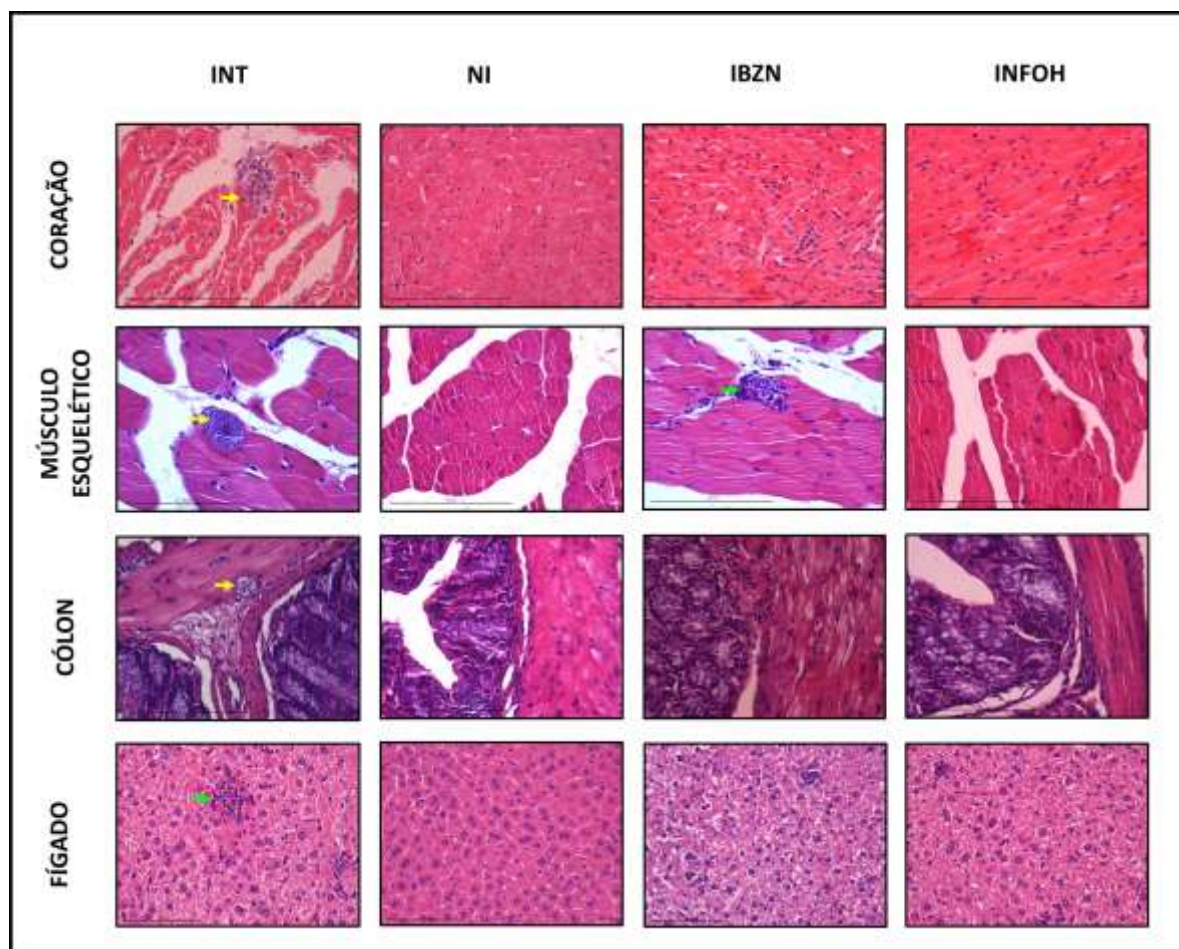
Os resultados das análises histológicas foram descritos na Figura 46, e suas imagens histopatológicas representativas na Figura 47. O grupo **INT** apresentou níveis inflamatórios, de calcificação, necrose e ninhos amastigotas superiores aos demais grupos estudados (**NI**, **IBZN** e **INFOH**), no entanto, não houve diferença estatística na análise do tecido muscular cardíaco e esquelético (Figuras 46, 47). Para o cólon, foi exibido intenso a moderada reação inflamatória em todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**). Necrose e ninhos amastigotas foram observados apenas no grupo **INT**. Não houve calcificação no colons dos camundongos Swiss do experimento I.

No tecido hepático, houve diferença estatística entre os achados inflamatórios do grupo **INT** e os demais grupos estudados (**NI**,  $p < 0,0001$ ; **IBZN**,  $p < 0,0001$ , **INFOH**,  $p < 0,0001$ ) (Figura 46, 47). O grupo **IBZN** apresentou intensos infiltrados inflamatórios em relação aos grupos **INFOH** ( $p < 0,0001$ ), e **NI** ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, foram identificados a presença de calcificação, áreas de necroses e ninhos amastigotas no fígado do grupo **INT**, ausentes nos outros grupos (**IBZN** e **INFOH**) (Figura 46, 47). As análises histopatológicas do baço e rins não foram exibidas diferença estatística entre todos os grupos do experimento I.



**Figura 46** - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos. INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Codificação histopatológica, crescente do branco ao azul escuro: 0-1,0 = leve (+); 1,1-2,0 = moderado (++); 2,1-3,0 = intenso (+++). (\*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,005$ ).

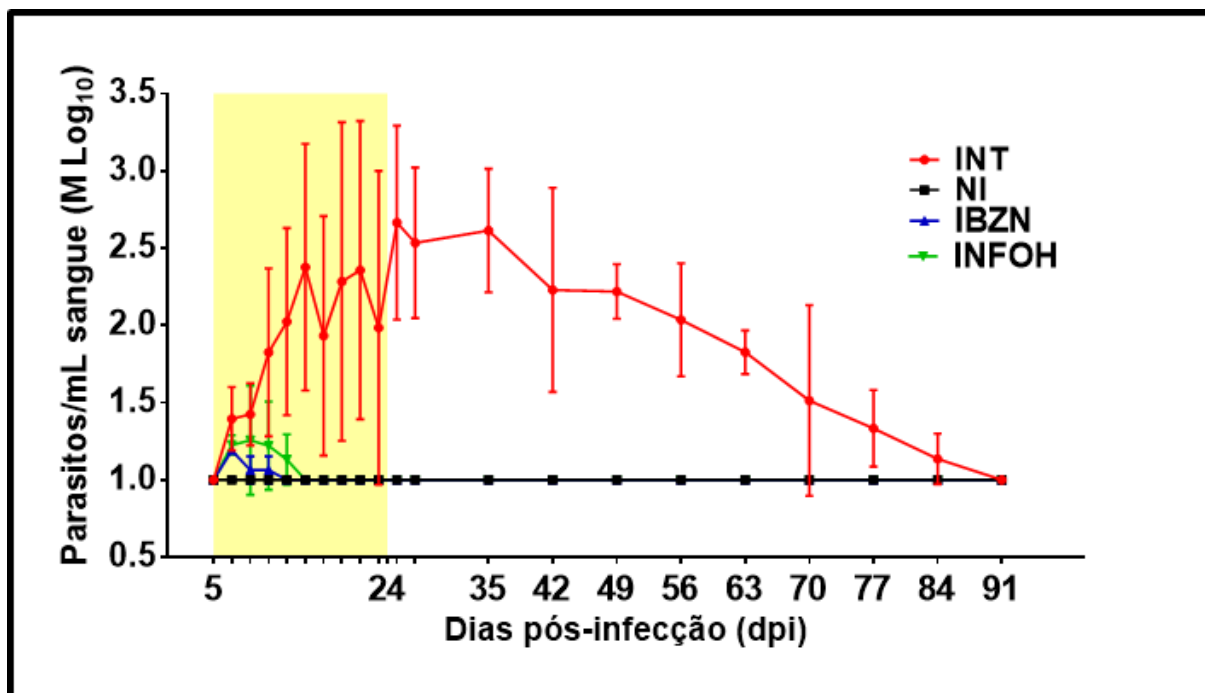
Fonte: dados da pesquisa.



**Figura 47** - Fotografia histopatológica representativa do coração (H&E, 400X), músculo esquelético (H&E, 400X), cólon (H&E, 400X) e fígado (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Seta amarela: presença de ninhos amastigotas; seta verde: infiltrados inflamatórios.

Fonte: dados da pesquisa.

A Figura 48 mostra o acompanhamento da parasitêmia no experimento I em fase aguda com cepa Bolívia de *T. cruzi*, em camundongos C57B16.



**Figura 48** - Média e desvio padrão dos níveis parasitêmicos de cada grupo observadas em camundongos C57Bl6 inoculados com  $1 \times 10^2$  formas da cepa Bolívia de *T. cruzi* – Experimento I. Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (20 dias).

Fonte: dados da pesquisa.

Observou-se que o período pré-patente foi de cinco dias (5dpi) e o pico parasitêmico foi de 9-11dpi para o grupo **INT**, e para os grupos **IBZN** e **INFOH** foi de 7 e 9dpi, respectivamente. Apenas o grupo **INT** apresentou óbito (37,5%) durante o protocolo experimental com três camundongos de um total de oito (3/8). A fase aguda permaneceu por cerca de 91dpi no grupo **INT**, já para os grupos infectados e tratados, **IBZN** e **INFOH**, este indicador persistiu por 13 e 15dpi, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5** - Resultados do acompanhamento parasitêmico e taxa de mortalidade durante o experimento I – C57Bl6 (cepa Bolívia de *T. cruzi*).

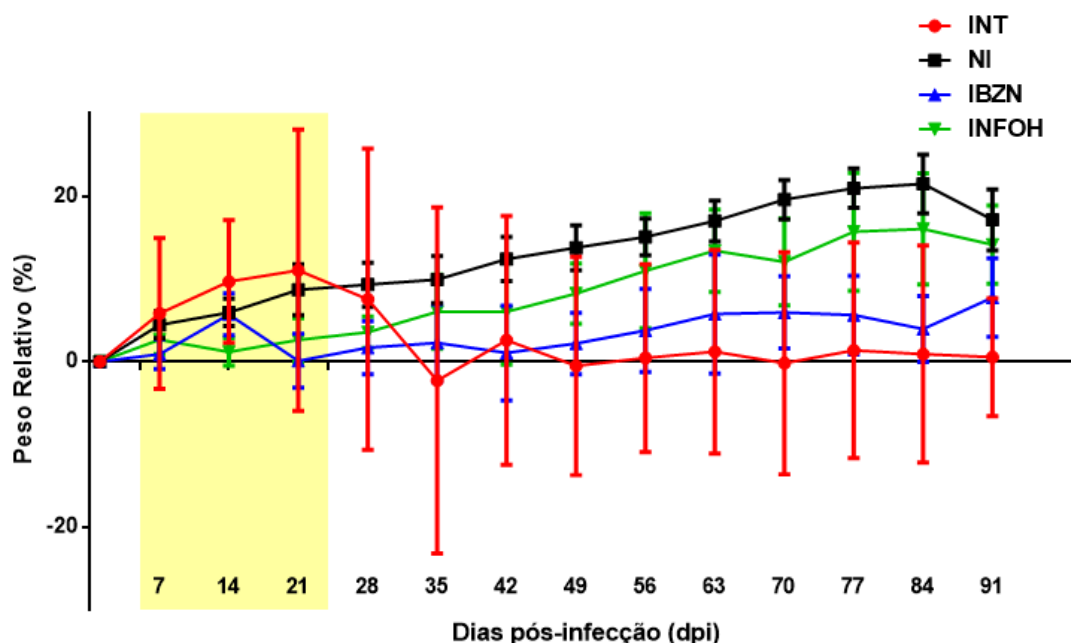
Grupos	% de infecção	Taxa de mortalidade (n, %)	Período pré-patente	Pico parasitêmico	Duração da fase aguda
<b>NI</b>	0	0	0	0	0
<b>INT</b>	100%	(3/8) 37,5%	5 dpi	9-11dpi	91dpi
<b>IBZN</b>	100%	0	5 dpi	7dpi	13dpi
<b>INFOH</b>	100%	0	5 dpi	9dpi	15dpi

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados relacionados ao peso relativo dos animais (experimento I), com camundongos C57Bl6, no decorrer de 91 dias de protocolo, e os valores obtidos foram expressos em porcentagem de peso relativo corpóreo (Figura 49). Os resultados apresentados mostram que houve diferença estatística ente os grupos **INT** e **NI** a partir do 56 dpi (8<sup>o</sup> semana), seguindo com esta superioridade de peso relativo corporeo, para o grupo **NI**, até o final do experimento (91 dpi). O grupo **IBZN** apresentou-se estatisticamente diferente, com valores menores, em relação ao grupo **NI**, sendo esta diferença iniciada no 21 dpi (últimos dias de tratamento) até o final do protocolo. Não houve diferença estatística entre os grupos **NI** e **INFOH**.



Figura 47-



**Figura 49** - Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos C57Bl6 infectados com  $10^2$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia do *T. cruzi* (INT, IBZN e INFOH), e grupo não infectado (NI).

Fonte: dados da pesquisa.

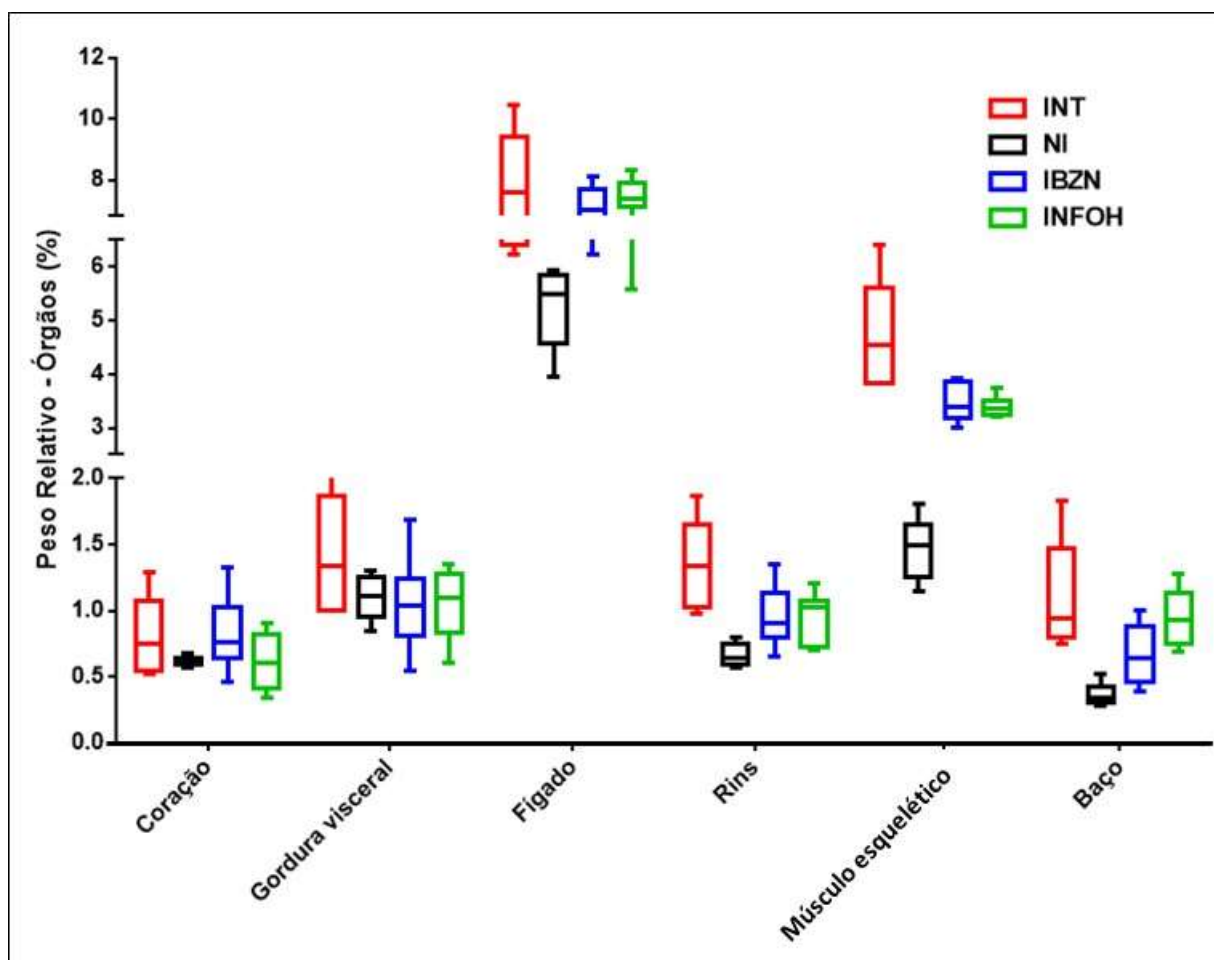
Os dados apresentados mostraram que o peso relativo do coração, para o experimento I (C57Bl6), não foi estatisticamente diferente para os grupos estudados (Figura 50), mesmo com a pequena variação do grupo não infectado (NI). Em relação ao peso relativo da gordura visceral, os resultados obtidos não apresentaram diferença estatística entre os grupos, apesar do grupo INT possuir a maior variação.

A respeito do peso relativo do fígado, foi possível observar diferença estatística do grupo NI em relação aos grupos infectados (INT,  $p = 0,0248$ ; IBZN,  $p = 0,0004$ ; INFOH,  $p = 0,0005$ ). Não houve diferença estatística quando comparados os grupos infectados (INT, IBZN e INFOH) (Figura 50).

Quanto aos rins, os resultados mostram diferença estatística do grupo NI em relação aos grupos infectados (INT,  $p = 0,0068$ ; IBZN,  $p = 0,0216$ ; INFOH,  $p = 0,0002$ ). Não houve diferença estatística quando comparados os grupos infectados (INT, IBZN e INFOH). Foram mensurados, também, o peso relativo do músculo esquelético dos animais. Os resultados obtidos mostram diferença significativa entre

os grupos infectados (**INT**,  $p < 0,0015$ ; **IBZN**,  $p = 0,0367$ ; **INFOH**,  $p = 0,0433$ ), e o grupo não infectado (**NI**), sendo este último (**NI**) com menor peso relativo do músculo esquelético em relação aos demais. Os animais dos grupos tratados, **IBZN** e **INFOH**, foram estatisticamente diferentes em relação ao grupo **INT** ( $p < 0,05$ ), que obteve maior peso relativo do músculo esquelético (Figura 50).

Os resultados dos baços mostram que houve diferença estatística do grupo **NI** em relação aos grupos infectados (**INT**,  $p = 0,0118$ ; **IBZN**,  $p = 0,0250$ ; **INFOH**,  $p < 0,0001$ ), não havendo diferença estatística em relação aos grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) apesar do grupo **INT** possuir a maior variação. Foi detectado diferença estatística entre os grupos infectados e tratado (**IBZN** e **INFOH**,  $p = 0,0404$ ) (Figura 50).

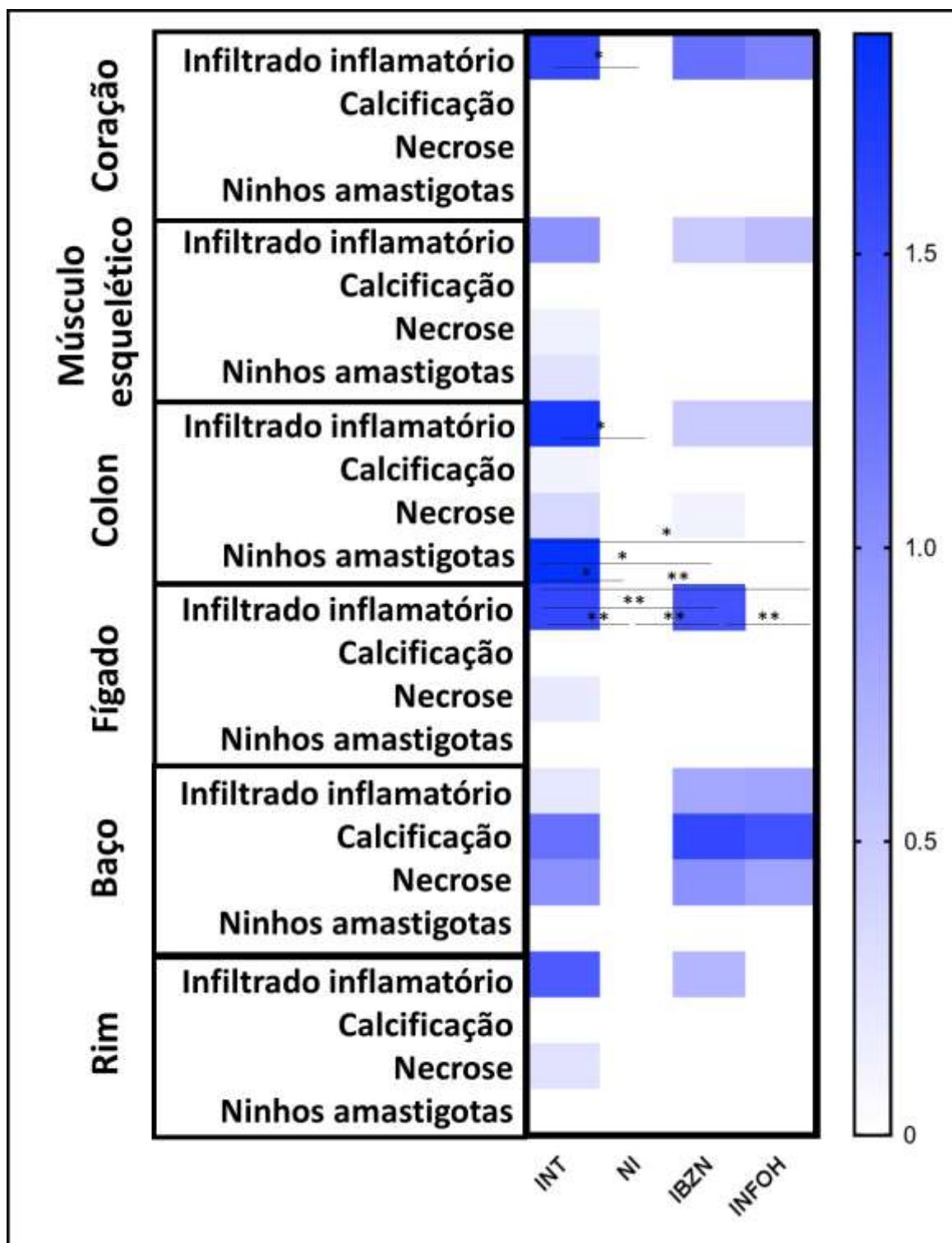


**Figura 50** - Peso relativo dos órgãos dos camundongos C57Bl6 (experimento I).

Fonte: dados da pesquisa

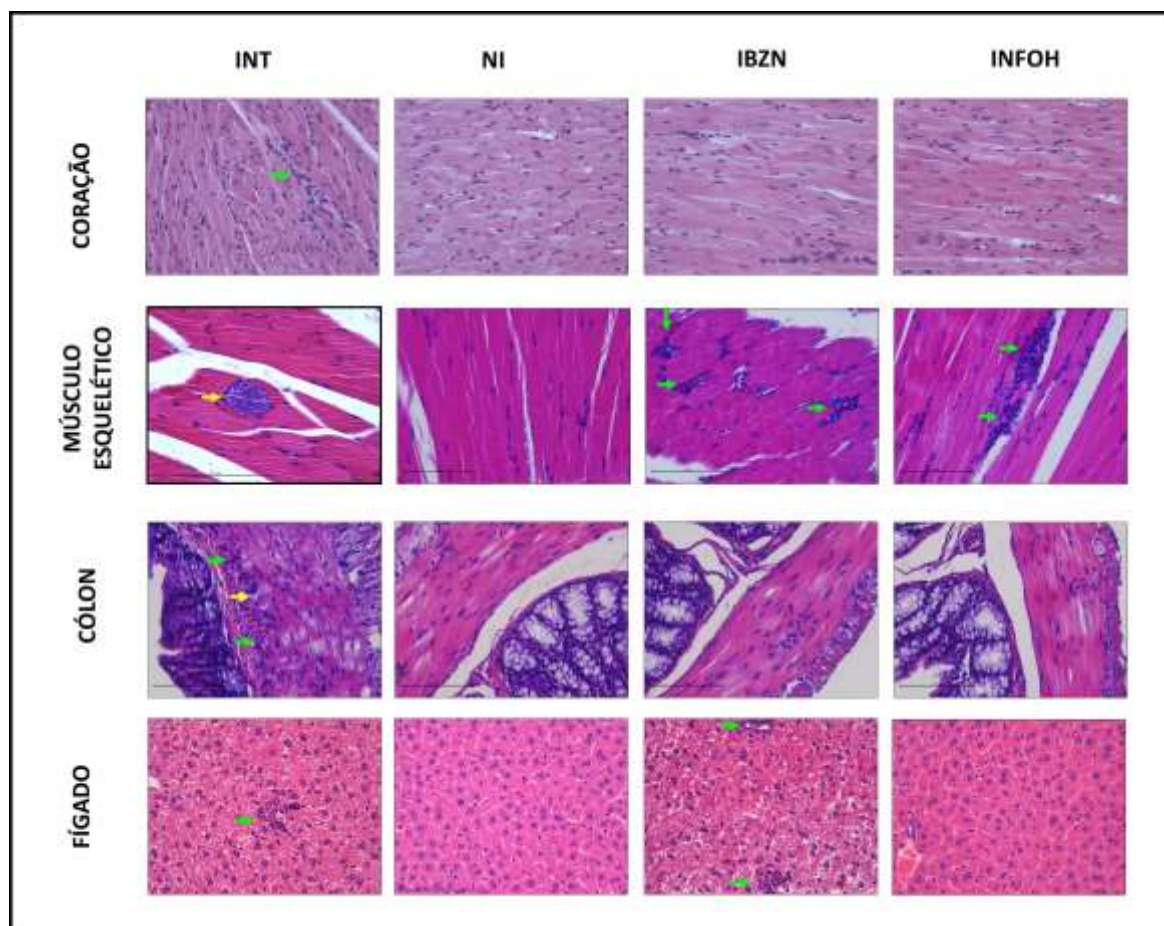
Os resultados do estudo histopatológico estão exibidos na Figura 51, e suas respectivas fotografias histológicas e representativas na Figura 52. O grupo **INT** demonstrou níveis inflamatórios, de calcificação, necrose e ninhos amastigotas superiores aos demais grupos infectados e tratados (**IBZN** e **INFOH**), porém, não apresentou diferença estatística na análise do tecido muscular cardíaco e esquelético. No entanto, foi observado diferença estatística na inflamação do tecido cardíaco entre os grupos **INT** e **NI** ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 51, 52). No cólon, foi identificado intenso à moderada reação inflamatória em todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), havendo diferença estatística, apenas, entre os grupos **INT** e **NI** ( $p < 0,0001$ ). Necrose e ninhos amastigotas foram observados apenas no grupo **INT**, mostrando diferença estatística com os demais grupos estudados (**NI**,  $p < 0,0363$ ; **IBZN**,  $p < 0,0209$ , **INFOH**,  $p = 0,0209$ ). Não houve calcificação no colons dos camundongos C57Bl6 do experimento I.

Para o tecido hepático, houve diferença estatística entre os achados inflamatórios do grupo **INT** e os demais grupos estudados (**NI**,  $p < 0,0001$ ; **IBZN**,  $p < 0,0001$ , **INFOH**,  $p < 0,0001$ ) (Figura 51, 52). O grupo **IBZN** apresentou intensos infiltrados inflamatórios em relação aos grupos **INFOH** ( $p < 0,0001$ ), e **NI** ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi observada a presença de pequenas áreas de necroses no fígado do grupo **INT**, ausentes nos outros grupos (**IBZN** e **INFOH**) (Figura 51, 52). As análises histopatológicas do baço e rins não foram exibidas diferença estatística entre todos os grupos do experimento I.



**Figura 51** - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos. INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Codificação histopatológica, crescente do branco ao azul escuro: 0-1,0 = leve (+); 1,1-2,0 = moderado (\*\*); 2,1-3,0 = intenso (+++). (\*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,005$ ).

Fonte: dados da pesquisa.

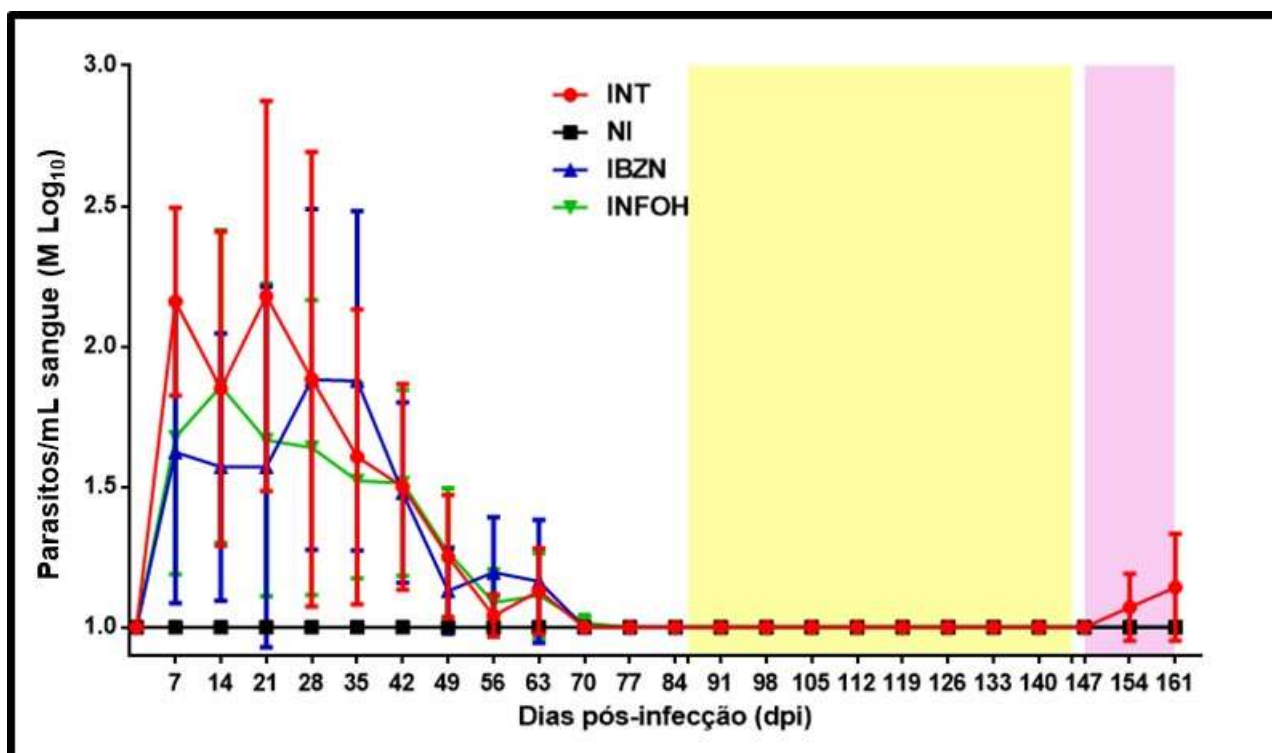


**Figura 52** - Fotografia histopatológica representativa do coração (H&E, 400X), músculo esquelético (H&E, 400X), cólon (H&E, 400X) e fígado (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Seta amarela: presença de ninhos amastigotas; seta verde: infiltrados inflamatórios.

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.1.2. EXPERIMENTO II'

Para o experimento II, o acompanhamento da parasitemia foi executado a partir do sétimo dia pós-infecção (7 dpi), sendo assim realizado semanalmente até o desaparecimento total das formas tripomastigotas 170-180 dpi, confirmada com três parasitêmias negativas em dias alternados. Os resultados do acompanhamento parasitêmico foram observados como reativação da doença apenas no grupo **INT** no 154 dpi e confirmado no 161 dpi. (Figura 53).



**Figura 53** - Média e desvio padrão dos níveis parasitêmicos de cada grupo observados em camundongos Balb/c inoculados com  $1 \times 10^2$  formas da cepa Bolívia de *T. cruzi* – Experimento II. Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (60 dias). Área em rosa representa período de imunossupressão (dexametasona 5 mg/kg/dia – 14 dias).

Fonte: dados da pesquisa.

A Tabela 6 a seguir mostra os resultados obtidos do experimento II. O período pré-patente foi de menos de sete dias (<7 dpi), e os valores do pico parasitêmico foi de 7-21 dpi para todos os grupos infectados. Durante a fase aguda, sem tratamento, a mortalidade variou de 25% a 33%. Não houve óbito de animais durante o período de tratamento, apenas um camundongo foi a óbito no grupo **INT**, após a imunossupressão. A fase aguda, para o modelo de infecção crônica da cepa Bolívia, permaneceu por 77 dpi.

**Tabela 6** - Resultados do acompanhamento parasitêmico e taxa de mortalidade durante o experimento II – Balb/c (cepa Bolívia de *T. cruzi*).

Grupos	% de infecção	Período pré-patente	Pico parasitêmico	Duração da fase aguda	Taxa de mortalidade após o tratamento (fase crônica, %)
<b>NI</b>	0	0	0	0	0
<b>INT</b>	100%	< 7 dpi	7-21dpi	77dpi	8,3%
<b>IBZN</b>	100%	< 7 dpi	7-21dpi	77dpi	0
<b>INFOH</b>	100%	< 7 dpi	7-21dpi	77dpi	0

Fonte: dados da pesquisa.

O ensaio indireto de xenodignóstico foi aplicado apenas para o experimento II, sendo realizado individualmente, 45 dias após o repasto sanguíneo entre as ninfas de triatomíneos (barbeiro) e o camundongo. Foram utilizadas três ninfas de três espécies diferentes de triatomíneos por animal, sendo possível observar formas tripomastigotas metacíclicas apenas nas fezes dos triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*, resultado positivo apenas para o grupo **INT** e ausentes nos demais grupos tratados (**IBZN**, **INFOH** e **NI**), dados estes expressos na Tabela 7.

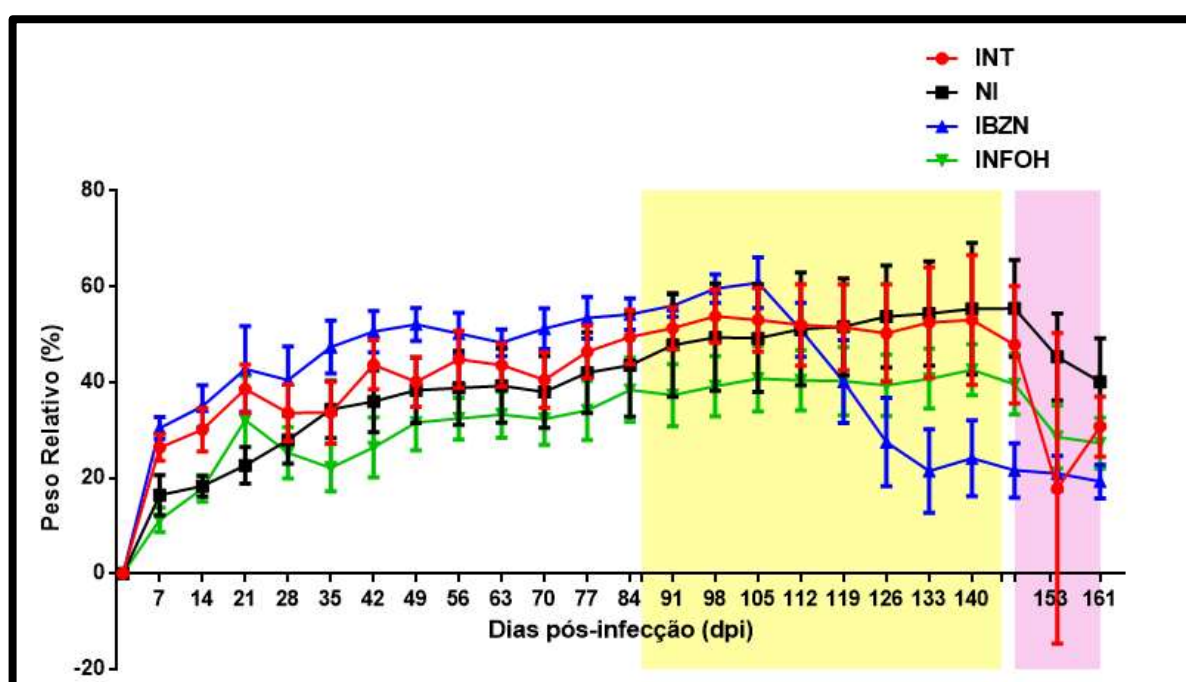
**Tabela 7** - Xenodiagnóstico realizado durante a fase de imunossupressão (pós- tratamento), experimento II.

Xenodiagnóstico / <i>Triatoma ssp</i>	INT			NI			IBZN			INFOH		
	22° semana	23° semana	24° semana	22° semana	23° semana	24° semana	22° semana	23° semana	24° semana	22° semana	23° semana	24° semana
<i>Rhodnius prolixus</i>	-	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Triatoma dimidiata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Triatoma infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: autor. Conforme descrito anteriormente, em material e métodos, foram utilizadas três ninfas de três diferentes tipos de ninfas de triatomíneos por camundongo (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*). Cada sinal de (+) representa a quantidade de animais positivos para xenodiagnóstico indireto; (-) ausência de parasitos durante o xenodiagnóstico..



No experimento **II**, os animais foram pesados semanalmente, no decorrer de 162 dias de protocolo, e os valores apresentados foram transformados em porcentagem de peso relativo corpóreo (Figura 54). A partir do 112dpi, 27 dias pós início do tratamento, os animais do grupo **IBZN** demonstraram acentuada perda de peso corpóreo, e conseqüentemente, diminuição do peso relativo corpóreo. Foi possível observar, também, piloereção mais acentuada em relação aos demais grupos (principalmente em comparação ao grupo **NI**), assim como notou-se letargia, contrações abdominais, desorientações do SNC e aparências físicas gerais debilitadas, características essas expressas, também, em alguns animais do grupo **INT** e ausentes no grupo **NI** e **INFOH**.



**Figura 54** - Experimento **II**. Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Balb/c infectados com  $1 \times 10^2$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bolívia do *T. cruzi* (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), e grupo não infectado (**NI**).

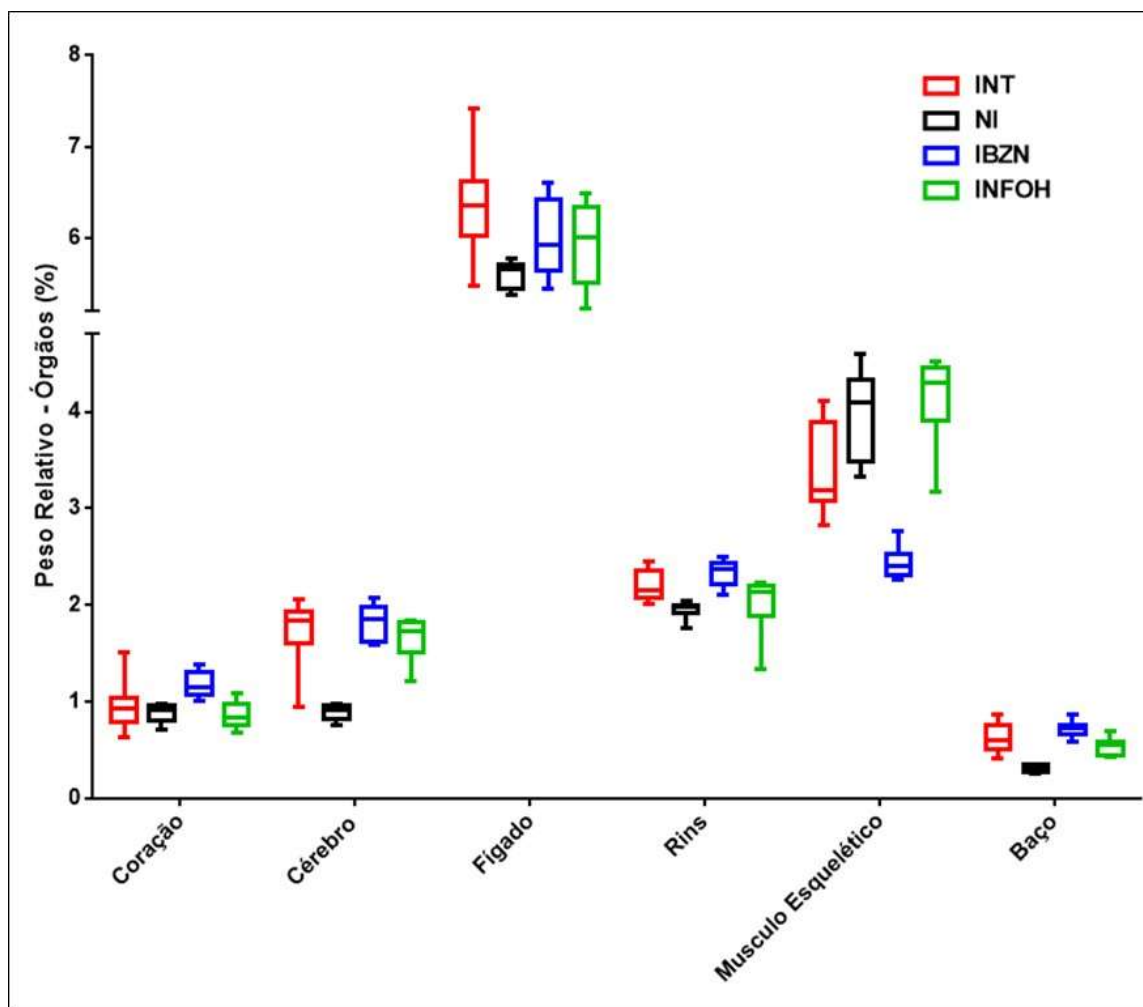
Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados do peso relativo dos órgãos do experimento **II** (Balb/c) estão apresentados na Figura 55. Observa-se que o peso relativo do coração, apresentou diferença estatística, apenas, entre o grupo **IBZN** e **NI** ( $p = 0,0270$ ), bem como **IBZN** e **INFOH** ( $p = 0,0064$ ), onde o grupo **IBZN** apresentou maior peso relativo do coração. Para o peso relativo do cérebro, o grupo **NI** exibiu diferença estatística, com menor peso relativo cerebral, quando comparado aos demais grupos estudados

(**INT**,  $p = 0,0061$ ; **IBZN**,  $p < 0,0008$ ; **INFOH**,  $p = 0,0062$ ). Para os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), não houve diferença entre os pesos relativos cerebrais e hepáticos, havendo diferença estatística no peso hepático, apenas, entre os grupos **INT** e **NI** ( $p = 0,0163$ ), o qual o grupo **INT** apresentou hepatomegalia. Ainda na Figura 55, estão apontados os valores dos pesos relativos dos rins, cujos valores demonstram diferença estatística do grupo **NI** (menor peso relativo renal) em relação aos grupos **INT** ( $p = 0,0052$ ) e **IBZN** ( $p = 0,0005$ ). Houve diferença estatística quando comparados os grupos **IBZN** e **INFOH** ( $p = 0,0257$ ), sendo o primeiro grupo (**IBZN**) com maior média de peso relativo renal (Figura 55).

Foram mensurados, também, o peso relativo do músculo esquelético dos animais. Os resultados obtidos mostram diferença significativa do grupo **IBZN** (maior peso relativo muscular) em relação aos demais grupos (**INT**,  $p = 0,0008$ ; **NI**,  $p = 0,0008$ ; e **INFOH**,  $p = 0,0064$ ). Além disso, o grupo **INT** demonstrou ser estatisticamente diferente quando comprado aos grupos **NI** ( $p = 0,0127$ ) e **INFOH** ( $p = 0,0322$ ) (Figura 55).

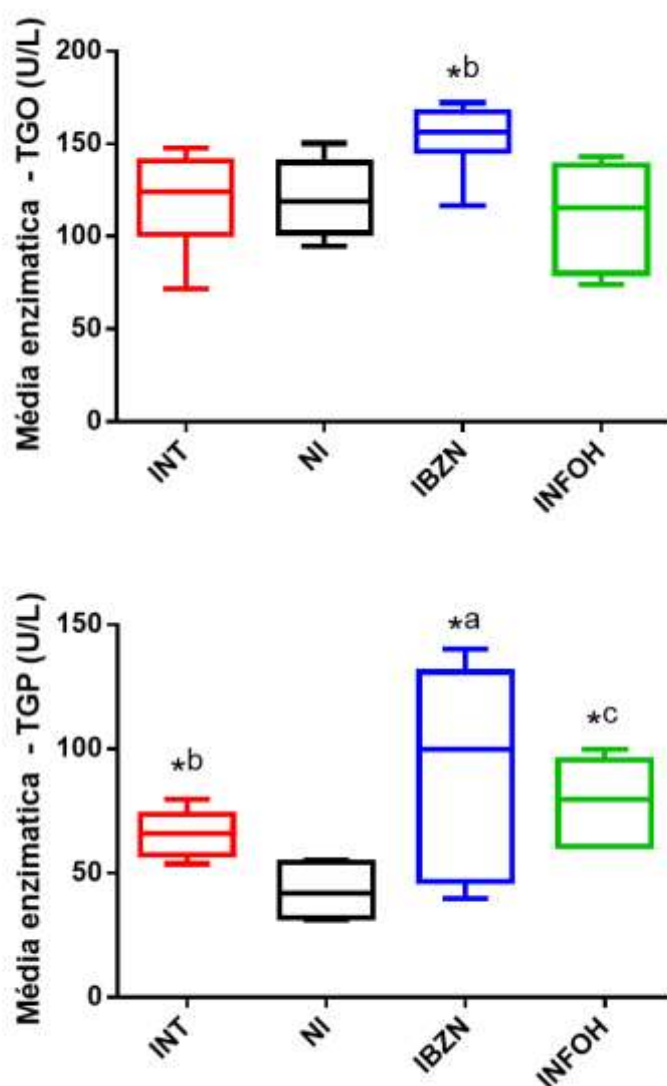
Os resultados do peso relativo do baço demonstram que houve diferença estatística do grupo **NI** em relação aos grupos infectados (**INT**,  $p = 0,0002$ ; **IBZN**,  $p = 0,0005$ ; e **INFOH**,  $p = 0,003$ ), havendo diferença estatística em relação aos grupos **IBZN** e **INFOH**, o primeiro grupo (**IBZN**) com maior média de peso relativo esplênico. Portanto, todos grupos infectados apresentaram esplenomegalia no experimento II. Além disso, foi possível observar diferença estatística entre os grupos infectados e tratados (**IBZN** e **INFOH**,  $p = 0,0242$ ) (Figura 55).



**Figura 55** - Peso relativo dos órgãos dos camundongos Balb/c (experimento II).  
Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.1.2.1. Análises Bioquímicas do experimento II

Os resultados obtidos por análise dos biomarcadores hepáticos (Figura 56, Tabelas 8 e 9), realizados apenas para o experimento II, mostram que houve diferença estatística na concentração da enzima TGO do grupo **IBZN** em relação ao grupo **NI** ( $p = 0,0060$ ), dados que corroboram estudos da literatura (forma indeterminada - cepa Y de *T. cruzi*) (SCARIM, 2016; SCARIM *et al.*, 2018). Para análise do biomarcador hepático TGP, houve diferença estatística entre os grupos **NI** e os demais grupos infectados (**INT**,  $p < 0,0038$ ; **IBZN**,  $p < 0,0143$ ; e **INFOH**,  $p = 0,0005$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), mesmo com o grupo **IBZN** apresentando enorme variação enzimática para TGP.



**Figura 56** - Resultados de biomarcadores hepáticos para os animais do experimento II. (\*): Estatisticamente diferente do grupo NI. (a):  $p < 0,05$ ; (b):  $p \leq 0,005$ ; (c):  $p \leq 0,0005$ .

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 8** - Comparação entre os valores de TGO dos animais do experimento II. Valores absolutos/animal, médias e desvio padrão dos grupos. (-): Óbito; (\*): plasma insuficiente para análise; (#): ausência de animal; (ND): não determinado.

INT		NI		IBZN		INFOH	
Animal	TGO (U/L)	Animal	TGO (U/L)	Animal	TGO (U/L)	Animal	TGO (U/L)
01	58,56	01	32,32	01	67,43	01	60,97
02	79,51	02	54,19	02	80,05	02	-
03	-	03	31,12	03	-	03	78,42
04	*	04	55,11	04	140,04	04	-
05	-	05	49,99	05	133,45	05	95,44
06	60,43	06	33,89	06	-	06	-
07	-	#	ND	07	123,59	07	79,51
08	71,64	#	ND	08	119,50	08	60,97
09	-	#	ND	09	39,84	09	99,656
10	*	#	ND	10	39,66	10	85,60
11	53,73	#	ND	11	-	11	*
12	71,53	#	ND	12	-	12	-
<b>Média</b>	65,9	<b>Média</b>	42,77	<b>Média</b>	92,94	<b>Média</b>	80,08
<b>Desvio padrão</b>	±9,81	<b>Desvio padrão</b>	±11,47	<b>Desvio padrão</b>	±41,36	<b>Desvio padrão</b>	±15,184

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 9** - Comparação entre os valores de TGP dos animais do experimento II. Valores absolutos/animal, médias e desvio padrão dos grupos. (-): Óbito; (\*): plasma insuficiente para análise.

INT		NI		IBZN		INFOH	
Animal	TGP (U/L)	Animal	TGP (U/L)	Animal	TGP (U/L)	Animal	TGP (U/L)
01	123,81	01	94,5	01	116,43	01	143,16
02	105,29	02	129,63	02	165,53	02	-
03	-	03	*	03	-	03	136,75
04	99,69	04	150,18	04	172,01	04	93,60
05	-	05	119,15	05	*	05	136,75
06	13,62	06	109,46	06	-	06	-
07	-	#	ND	07	155,70	07	138,85
08	71,64	#	ND	08	*	08	73,96
09	-	#	ND	09	156,89	09	82,99
10	124,76	#	ND	10	155,70	10	79,02
11	147,59	#	ND	11	-	11	-
12	144,25	#	ND	12	-	12	-
<b>Média</b>	118,45	<b>Média</b>	120,58	<b>Média</b>	153,71	<b>Média</b>	110,63
<b>Desvio padrão</b>	±25,20	<b>Desvio padrão</b>	±20,99	<b>Desvio padrão</b>	±19,40	<b>Desvio padrão</b>	30,74

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.1.2.2. Análises Histopatológicas do experimento II

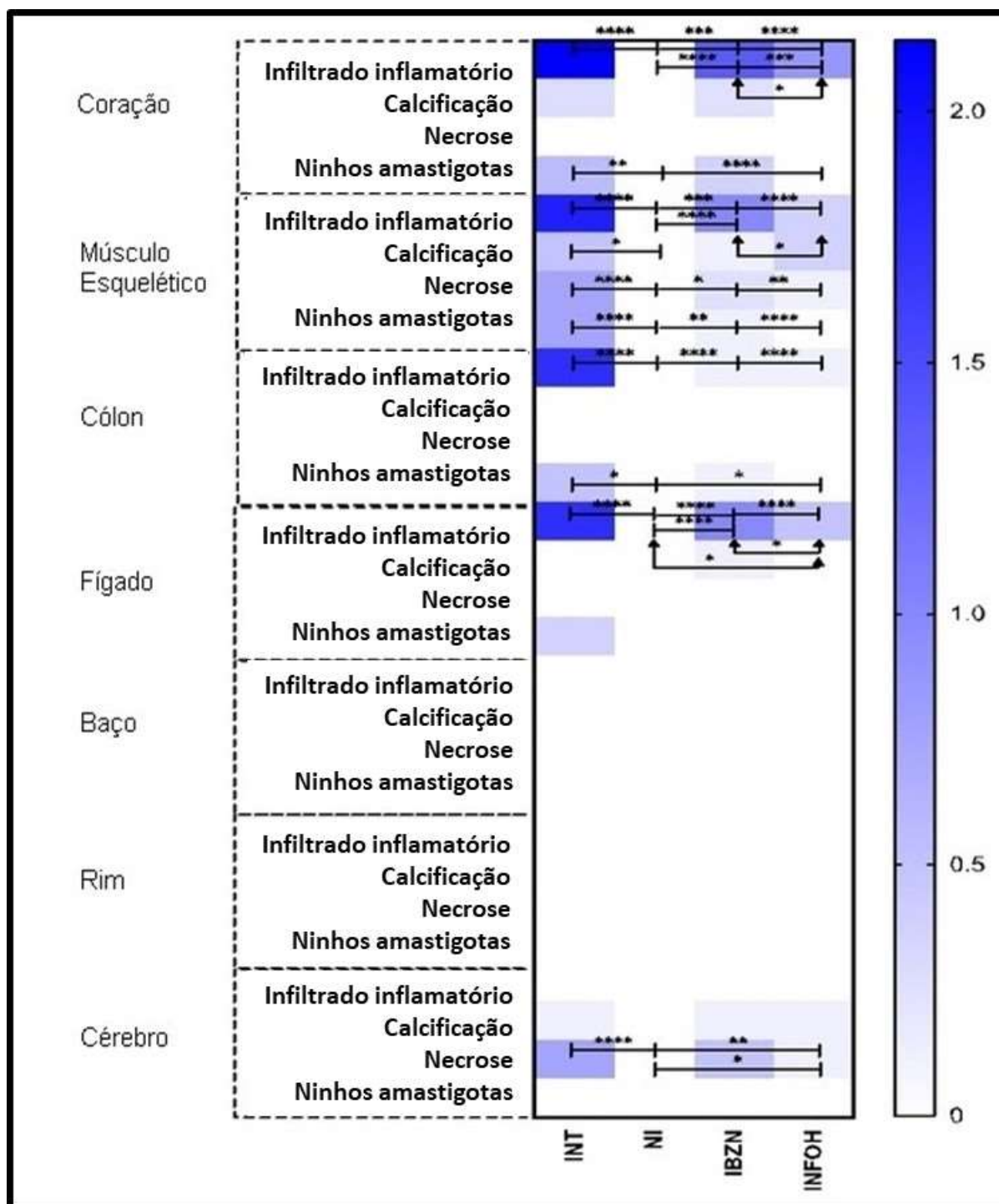
Os resultados histológicos do experimento II, também, foram codificados e transformados em scores histopatológicos para melhor compreensão dos resultados: (0,0 – 1,0; +) ausência ou inflamação leve, ausência ou calcificação leve, ausência ou necrose leve e ausência ou raros ninhos amastigotas. (1,1 – 2,0; ++) inflamação moderada, calcificação moderada, necrose moderada e moderada presença de ninhos amastigotas; (2,1 – 3,0; +++) inflamação intensa, calcificação intensa, necrose intensa e acentuada presença de ninhos amastigotas (Figuras 57 – 60)

Na análise histopatológica de infiltrados inflamatórios cardíacos, o grupo **NI** demonstrou ser significativamente menor quando comparados aos grupos infectados (**INT**, **IBZN**, **INFOH**) ( $p < 0,0001$ ). Similarmente, foi possível observar diferença estatística entre os grupos infectados e tratados (**IBZN**, **INFOH**) em relação ao grupo infectado não tratado (**INT**) ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi identificado resultado expressivo para os dois grupos infectados e tratados, com o grupo **IBZN** demonstrando maior intensidade de infiltrados inflamatórios cardíacos que o grupo **INFOH** ( $p = 0,0205$ ) (Figura 57). Calcificação distrófica cardíaca foi reportada nos grupos **INT** e **IBZN**, e ausentes nos grupos **NI** e **INFOH**, porém, não houve diferença estatística. Áreas de necrose não foram identificadas no coração dos animais do experimento II. Para os achados de ninhos amastigotas, identificou-se a presença nos grupos **INT** e **IBZN**, no entanto, foi relatado diferença estatística apenas entre o grupo **INT** quando comparado aos grupos **NI** e **INFOH** ( $p < 0,0001$ ) (Figura 57, 58).

Na análise do músculo esquelético, o grupo **INT** apresentou acentuados e intensos achados inflamatórios em relação aos demais grupos estudados (**NI**, **IBZN**, **INFOH**) ( $p < 0,0001$ ). Também, observou-se diferença inflamatória entre os grupos **NI** e **IBZN** ( $p < 0,0001$ ). Ainda em relação à inflamação muscular esquelética, houve diferença estatística para os grupos infectados e tratados (**IBZN**, **INFOH**) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 57, 58). O grupo **INT** apresentou-se estatisticamente diferente quanto as calcificações distróficas no músculo esquelético em relação ao grupo **NI** ( $p = 0,0205$ ). A presença de áreas de necrose indentificou-se apenas no grupo **INT**, sendo assim, estatisticamente diferente quando coparado aos demais grupos (**NI**,  $p < 0,0001$ ; **IBZN**,  $p = 0,0205$ ; **INFOH**,  $p = 0,018$ ). Na análise de ninhos amastigotas, foram encontrados nos grupos **INT** e **IBZN** ( $p = 0,018$ ). Além disso, identificou-se

diferenças entre o grupo **INT** quando comparado aos grupos **NI** e **INFOH** ( $p < 0,0001$ ) (Figura 57, 58). Para a análise do cólon, observou-se diferença estatística relacionada aos achados inflamatórios do grupo **INT** em relação aos demais grupos estudados (**NI**, **IBZN**, **INFOH**) ( $p < 0,0001$ ). Na análise de ninhos amastigotas, foram encontrados ninhos nos grupos **INT** e **IBZN**, no entanto, identificou-se diferença apenas entre o grupo **INT** quando comparado ao grupo **NI** ( $p = 0,0205$ ). Nos grupos **NI** e **INFOH** não foram observados ninhos amastigotas. Além disso, não foram encontradas áreas de necrose e calcificação distrófica nos cólons dos animais do experimento II (Figura 57, 59).

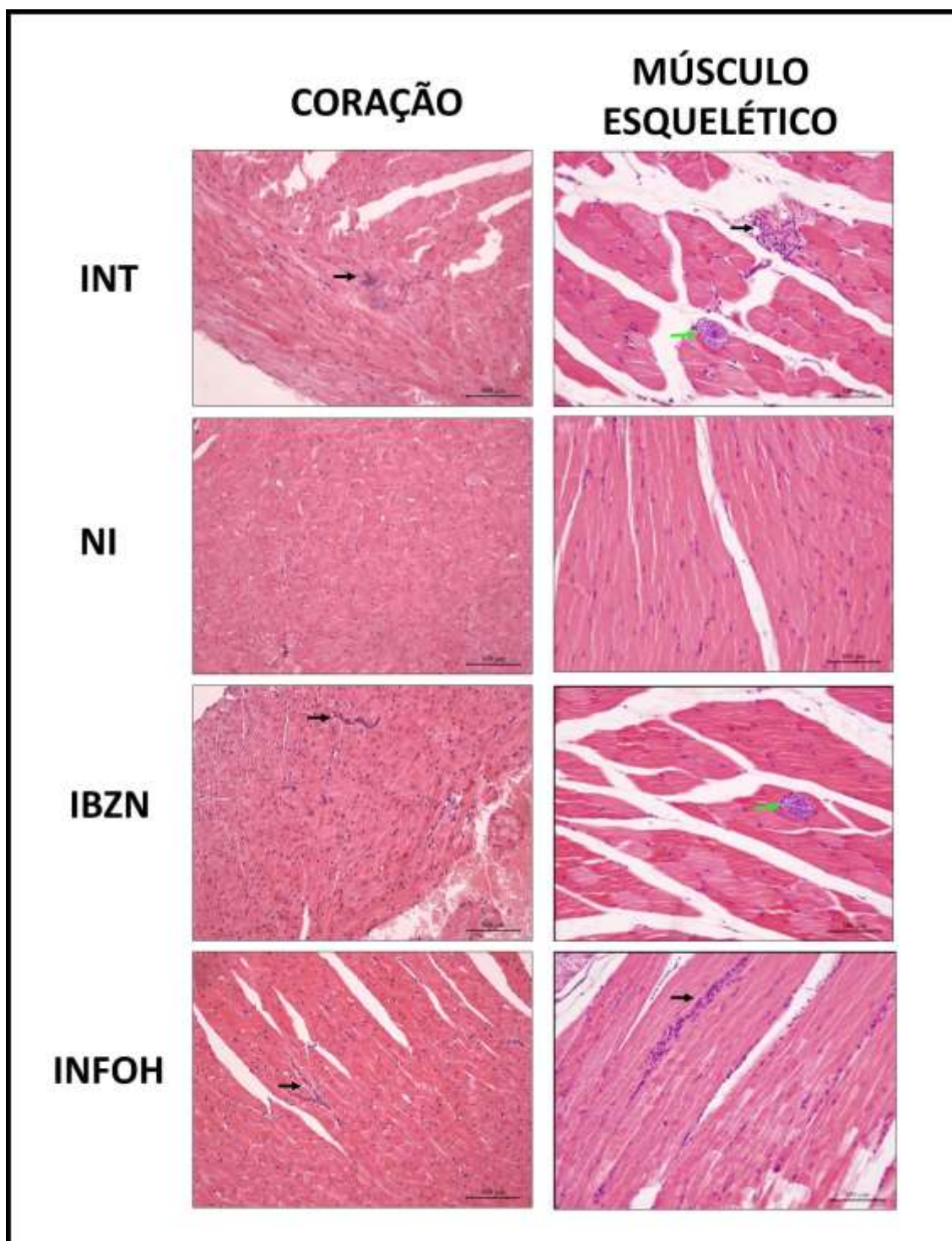
A análise histopatológica do fígado apresentou diferença estatística, em relação aos achados inflamatórios, entre o grupo não infectado **NI** e os grupos infectados **INT** ( $p < 0,0001$ ), **IBZN** ( $p < 0,0001$ ), e **INFOH** ( $p = 0,0205$ ). Também foi observado diferença na inflamação hepática do grupo infectado não tratado (**INT**) e os grupos infectados e tratados **IBZN** e **INFOH** ( $p = 0,0205$ ). Foram identificadas áreas de necrose tecidual hepática apenas no grupo **IBZN**, e a presença de ninhos amastigotas apenas no grupo **INT** (Figura 57, 59). Os tecidos esplênicos e renais foram analisados e apresentaram normalidade para todos os grupos avaliados. Para o cérebro, todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) exibiram achados com calcificação distrófica, mas não apresentaram diferença estatística. Ademais, foram observadas áreas de necrose em todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), porém, com diferença estatística entre o grupo **INT** e os grupos **NI** ( $p < 0,0001$ ) e **INFOH** ( $p = 0,018$ ), bem como entre os grupos **NI** e **IBZN** ( $p = 0,0205$ ). Não foram encontrados achados histopatológicos com a presença de infiltrados inflamatórios e ninhos amastigotas de *T. cruzi* (Figura 57, 60).



**Figura 57-** Análise histopatológica dos órgãos e tecidos do experimento II. INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofur. Codificação histopatológica, crescente do branco ao azul escuro: 0-1,0 = leve (+); 1,1-2,0 = moderado (\*\*); 2,1-3,0 = intenso (+++). (\*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*) estatisticamente diferente ( $p \leq 0,005$ ).

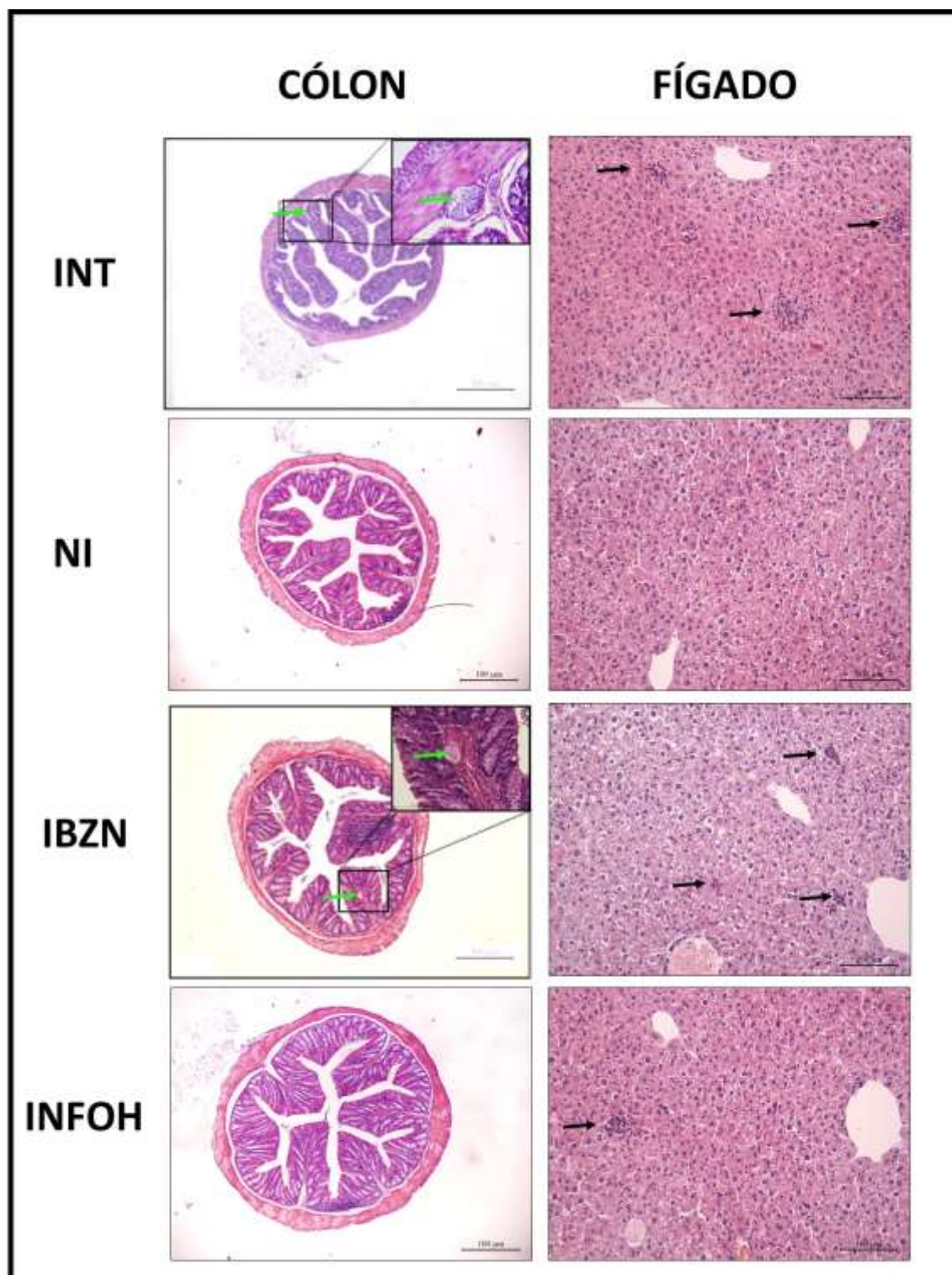
Fonte: dados da pesquisa.





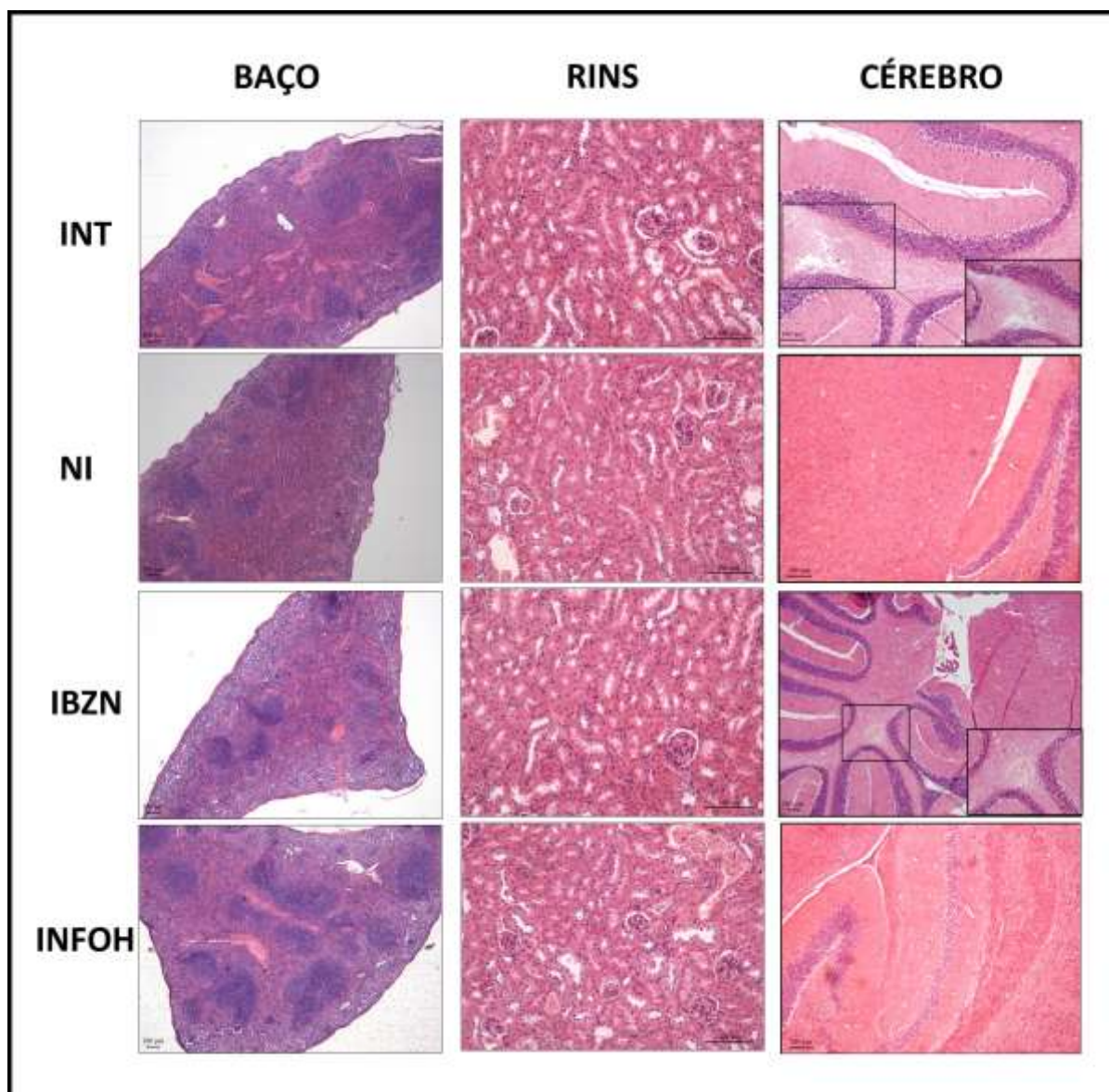
**Figura 58** - Fotografia histopatológica representativa do coração (H&E, 200X) e músculo esquelético (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Seta verde: presença de ninhos amastigotas; seta preta: infiltrados inflamatórios.

Fonte: dados da pesquisa.



**Figura 59** - Fotografia histopatológica representativa do cólon (H&E, 50X e 400X) e fígado (H&E, 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril. Seta verde: presença de ninhos amastigotas; seta preta: infiltrados inflamatórios.

Fonte: dados da pesquisa.



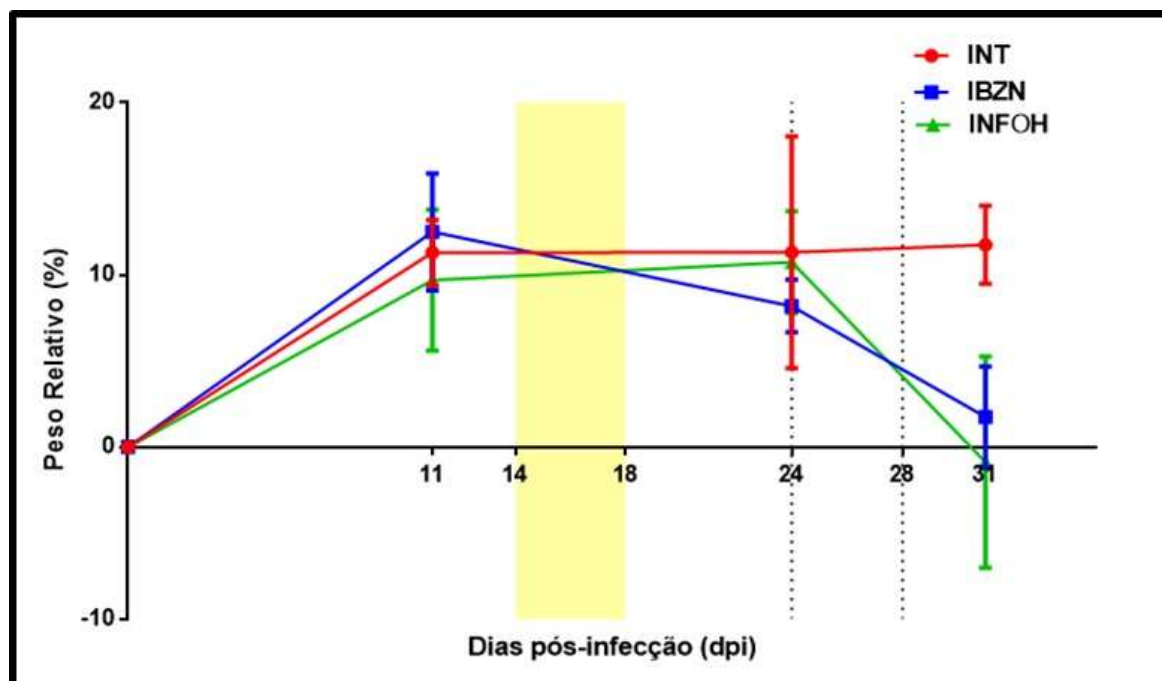
**Figura 60** – Fotografia histopatológica representativa do baço (H&E, 50X) e rins (H&E, 100X) e cérebro (H&E, 50X e 200X). INT: infectado e não tratado, apenas veículo; NI: não infectado e não tratado, apenas veículo; IBZN: infectado e tratado com benznidazol; INFOH: infectado e tratado com hidroximetilnitrofuril.

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.1.3. EXPERIMENTO III

No decorrer de 31 dias de protocolo, os animais foram pesados durante os dias de captura de imagem por bioluminescência, e os valores obtidos foram expressados em porcentagem de peso relativo corpóreo (Figura 61). Os resultados

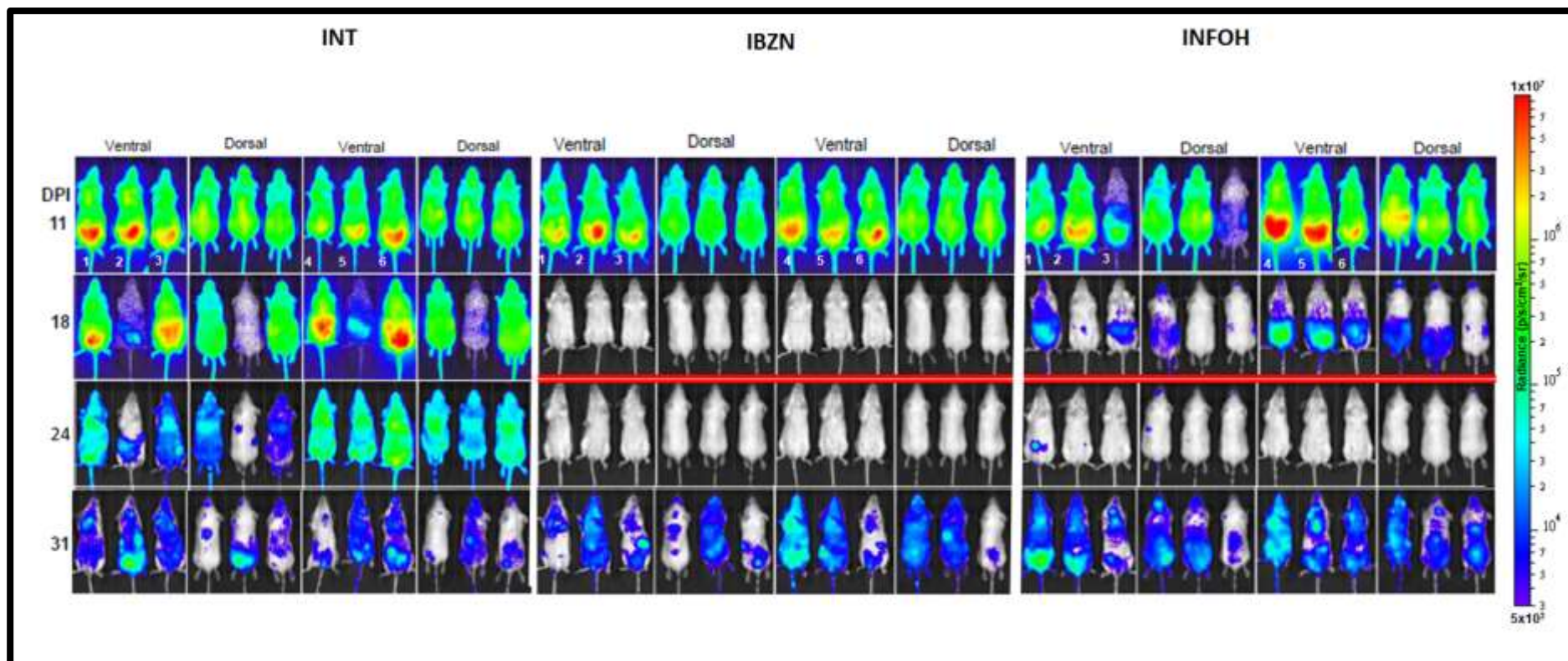
apresentados mostram que houve diferença estatística apenas no dia 31dpi entre o grupo **INT** e os grupos **IBZN** e **INFOH**.



**Figura 61** - Experimento III. Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Balb/c infectados com  $10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL Brener bioluminescente do *T. cruzi* (**INT**, **IBZN** e **INFOH**). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Linhas pontilhadas representam as doses de imunossupressão (ciclofosfamida 200 mg/kg).

Fonte: dados da pesquisa.

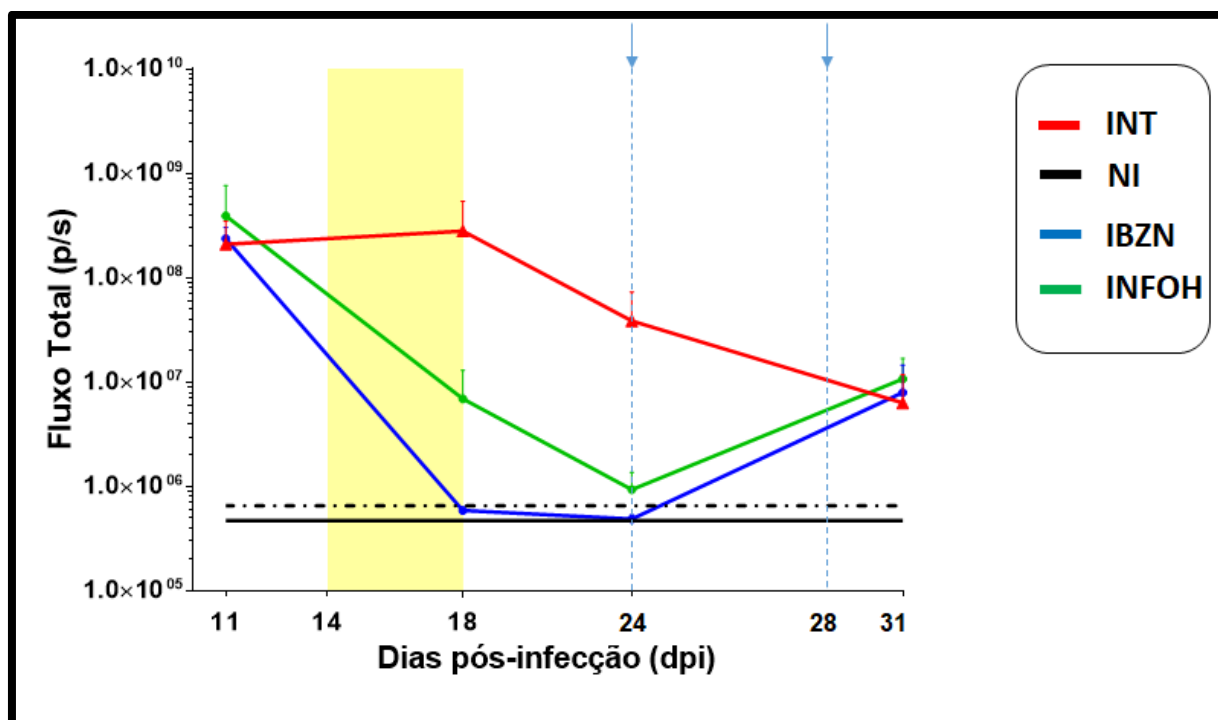
No experimento III, o monitoramento da parasitemia (cepa Brener CL bioluminescente) dos grupos estudados foi realizado por meio de imagens de bioluminescência, como mostrado na Figura 62. Os animais foram tratados durante o pico da parasitemia (11dpi). O grupo **IBZN** apresentou negativação em 100% dos animais, após os cinco dias de tratamento (18dpi), mantidos durante a primeira imunossupressão. Entretanto, após a segunda dose de ciclofosfamida (200 mg/kg) todos os animais retornaram sua infecção, não promovendo cura (0% cura). Para o grupo **INFOH**, 18dpi, os resultados não mostraram eliminação dos parasitos dos animais analisados. Após a primeira dose de imunossupressão, observou-se a eliminação dos parasitos em 83,33% (5/6) dos animais. No entanto, com a segunda dose de ciclofosfamida todos os animais retornaram com parasitemia (0% cura).



**Figura 62** - Parasitemia por imagens de bioluminescência de cada grupo foi observada nos dias executado nos dias 11, 18, 24 e 31dpi (dias pós infecção) em camundongos Balb/c inoculados com  $1 \times 10^3$  formas da cepa CL Brener Bioluminescente de *T. cruzi* – Experimento III. Linha vermelha representa o período de imunossupressão (ciclofosfamida 200) realizados nos dias 24 e 28dpi. Período de tratamento: 14-18dpi.

Fonte: dados da pesquisa.

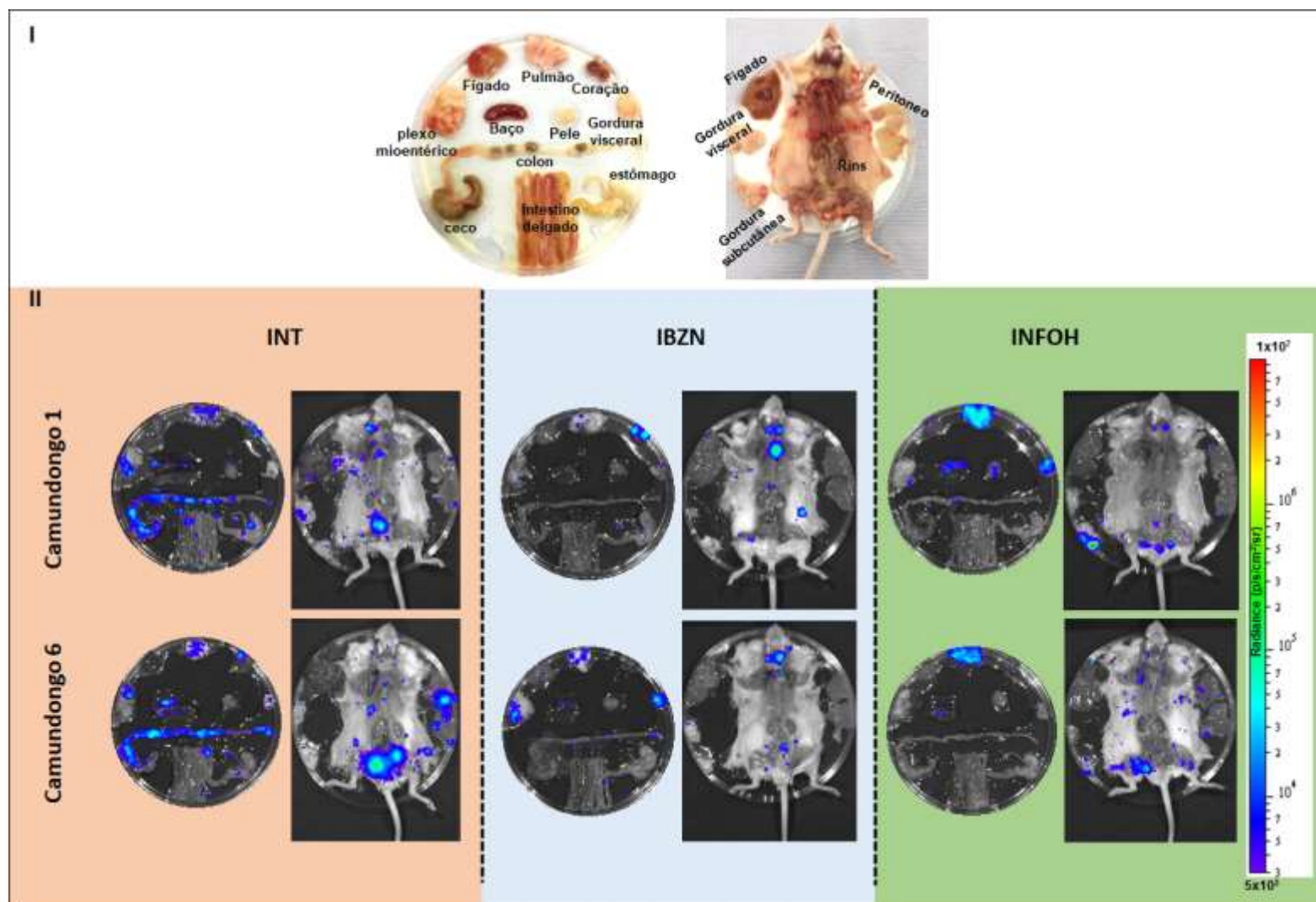
O acompanhamento da parasitemia descrito anteriormente foi executado nos dias 11, 18, 24 e 31dpi, e os valores obtidos em *fótons* por segundo (p/s) estão expressos na Figura 63.



**Figure 63** - Parasitemia do experimento III, expressados em valores de *fótons* por segundo (p/s). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Seta azul (linha pontilhada) representa doses de imunossupressão (ciclofosfamida 200mg/kg).

Fonte: dados da dissertação.

Estudo agudo com cepa Brener CL bioluminescente. Foram escolhidos, aleatoriamente, os animais 1 e 6 dos grupos infectados para análise *ex vivo* por imagem, em que foi possível observar os parasitos no interior dos camundongos, notadamente com maiores índices parasitários no intestino, plexo mioentérico e pulmão (Figura 64).



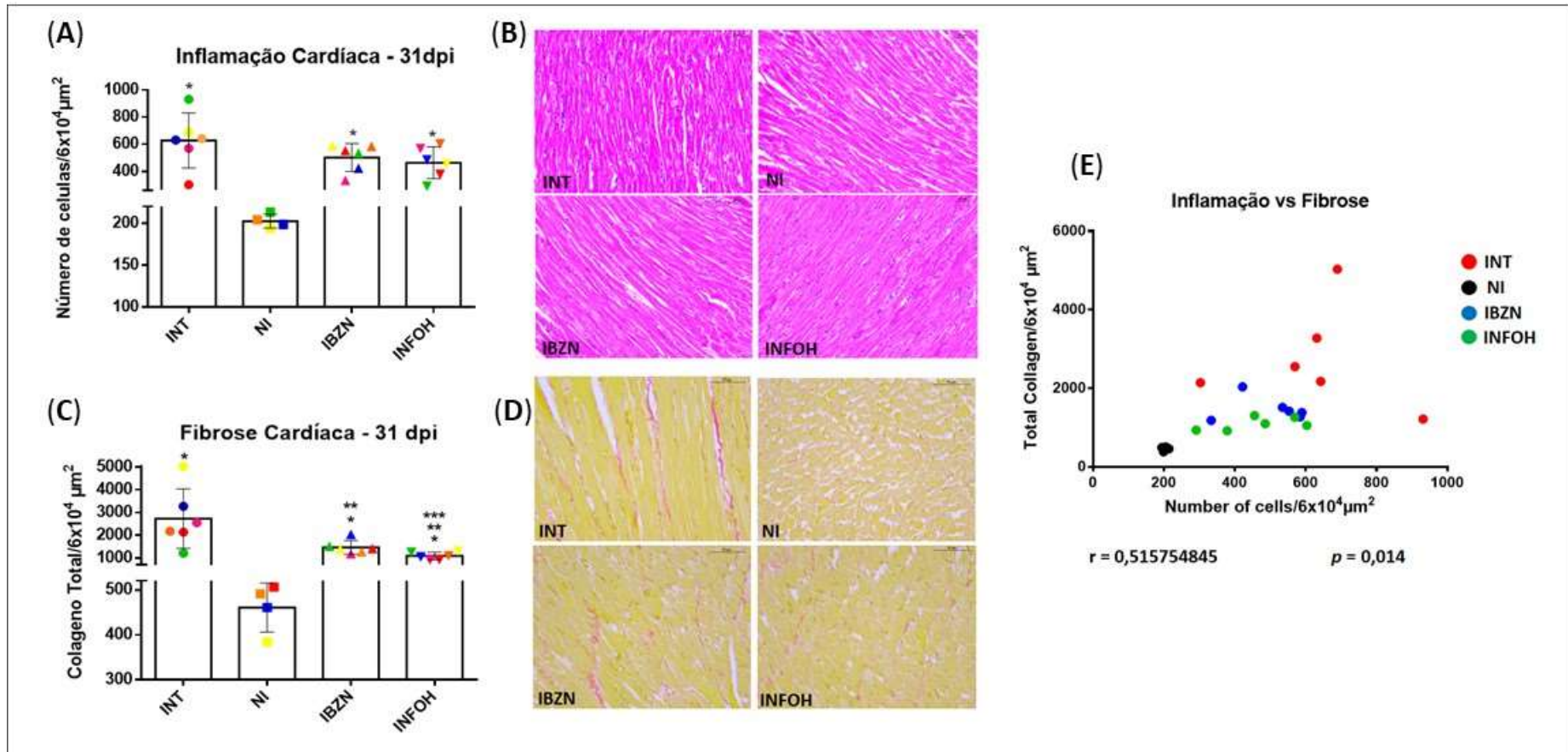
**Figure 64** - Análise ex vivo por imagem dos camundongos Balb/c (experimento III).  
 Fonte: dados da pesquisa.

As análises histopatológicas de infiltrados inflamatórios do coração dos animais do experimento **III** (fase aguda da doença de Chagas – CL Brener bioluminescente), mostrou diferença estatística entre todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) comparado ao grupo **NI** (Figura 65).

O tecido cardíaco foi avaliado quanto à presença de rede fibrina, ou seja, quantidade de colágeno total, onde foi possível observar diferença estatística significativa entre todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) comparado ao grupo **NI**. Além disso, os resultados apontaram diferença estatística entre o **INT** e os grupos com tratamento (**IBZN** e **INFOH**) (Figura 65). Houve, também, diferença significativa entre os grupos **IBZN** e **INFOH**, em que o último grupo apresentou menor quantidade de fibrose cardíaca em relação ao primeiro.

Para complementar o estudo, foi realizado o teste estatístico de correlação de Pearson, o qual demonstrou uma correlação positiva moderada ( $r = 0,515754845$ ;  $p = 0,014$ ) entre os achados inflamatórios e quantidade total de colágeno no coração dos animais do experimento **III** (fase aguda da doença de Chagas) (Figura 65).



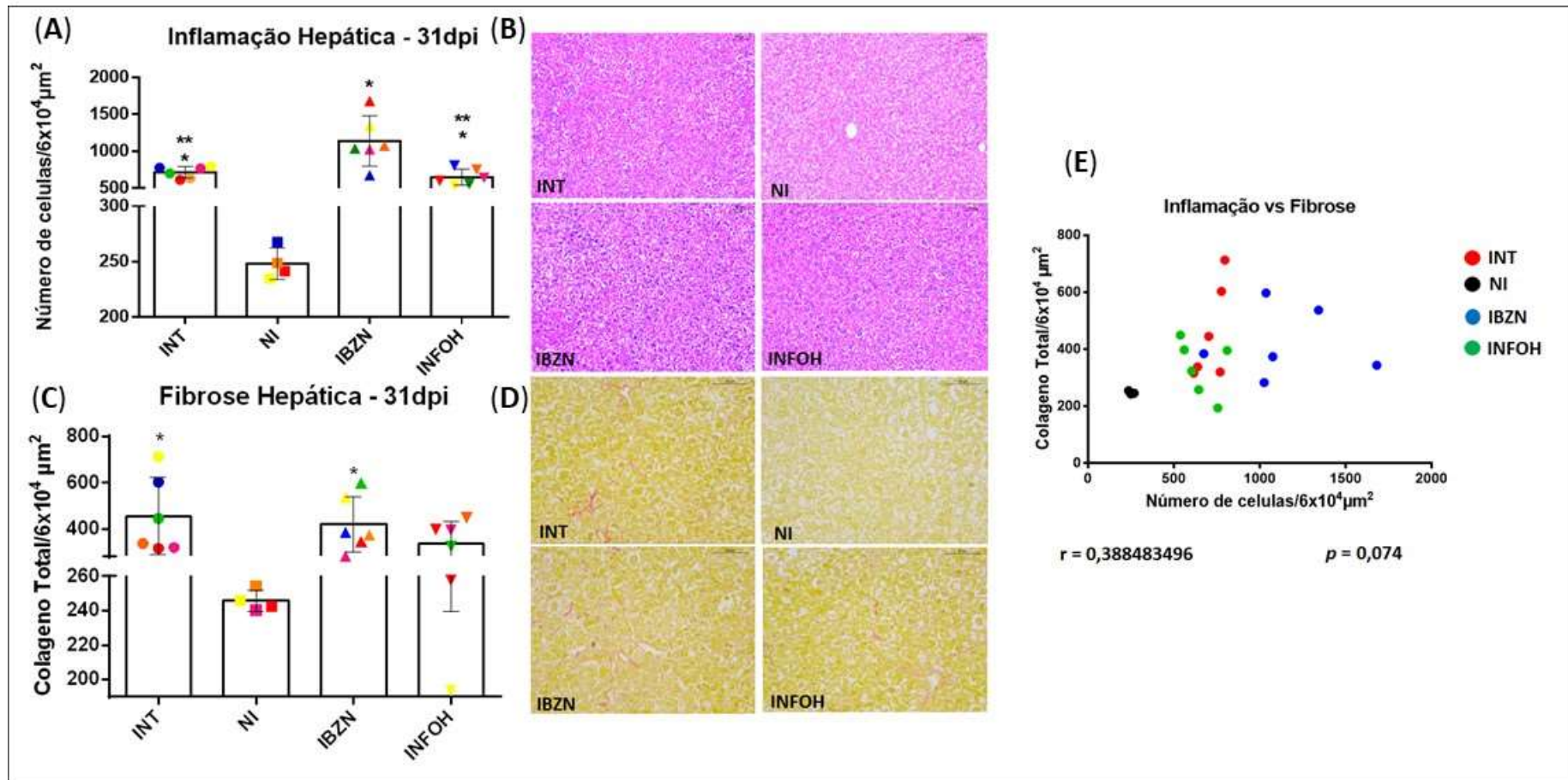


**Figura 65** - Resultados obtidos da análise histopatológica do coração dos animais do experimento III em relação ao número de infiltrados inflamatórios (A e B, Hematoxilina e Eosina) e a quantidade total de colágeno (C e D, picrosiriusred); Correlação de Pearson (E) entre ambas as medidas. (\*): estatisticamente diferente do grupo NI. (\*\*) estatisticamente diferente do grupo INT. (\*\*\*) estatisticamente diferente do grupo IBZN.

Fonte: dados da pesquisa.

As análises histopatológicas hepáticas foram avaliadas quanto aos achados inflamatórios dos animais do experimento **III** (fase aguda da doença de Chagas – CL Brener bioluminescente), que demonstrou diferença estatística entre os todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) em relação ao grupo **NI** (Figura 66), além de diferença estatística entre os grupos **INT** e **INFOH** comparados ao grupo **IBZN**. O tecido hepático apresentou diferença estatística quanto à quantidade de fibrose entre os grupos **INT** e **IBZN** em relação ao grupo **NI**. O grupo **INFOH** não mostrou diferença estatística com nenhum grupo estudado.

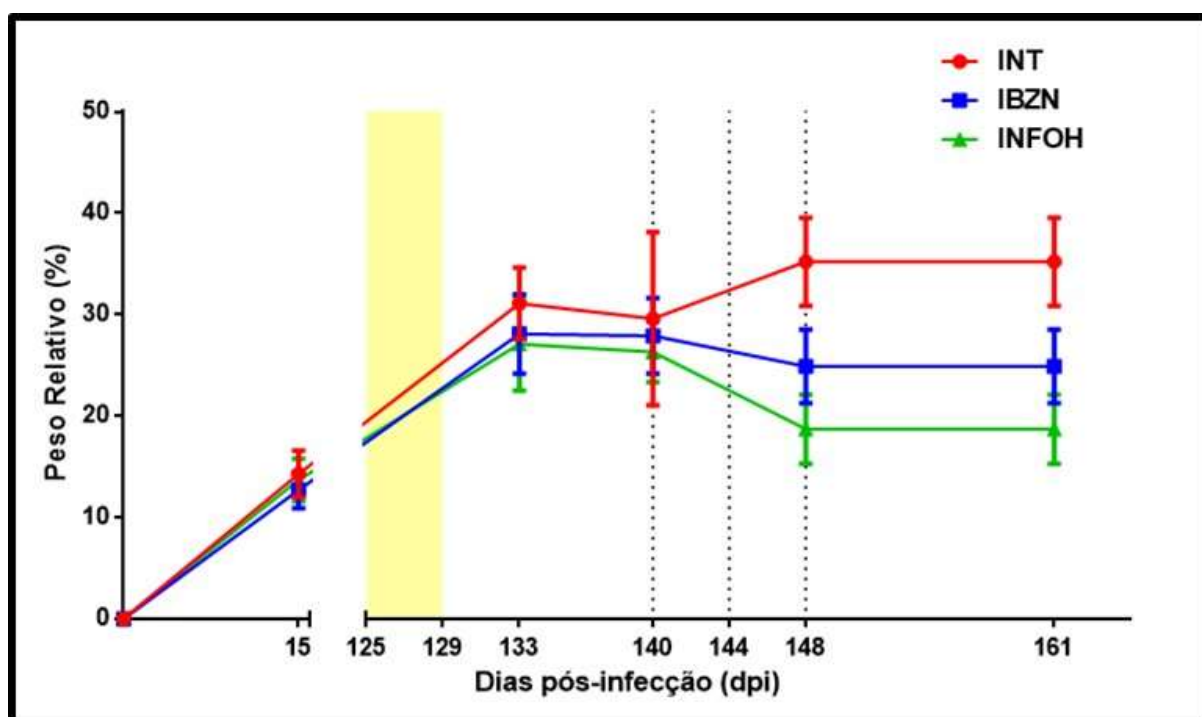
A seguir, foi executado o teste estatístico de correlação de Pearson, que mostrou correlação positiva fraca ( $r = 0,388483496$ ;  $p = 0,074$ ) junto aos infiltrados inflamatórios e fibrose hepática no coração dos animais do experimento **III** (fase aguda da doença de Chagas) (Figura 66).



**Figura 66** - Resultados obtidos da análise histopatológica do fígado dos animais do experimento III em relação ao número de infiltrados inflamatórios (A e B, Hematoxilina e Eosina) e a quantidade total de colágeno (C e D, picrosiriusred); Correlação de Pearson (E) entre ambas as medidas. (\*): estatisticamente diferente do grupo NI. (\*\*): estatisticamente diferente do grupo IBZN. Fonte: dados da pesquisa..

#### 4.1.4. EXPERIMENTO IV

No decorrer de 163 dias de protocolo, os animais foram pesados durante os dias de captura de imagem por bioluminescência e os valores obtidos foram expressados em porcentagem de peso relativo corpóreo (Figura 67). Os resultados apresentados mostram que houve diferença estatística a partir do dia 148dpi entre o grupo **INT** e os grupos **IBZN** e **INFOH**.

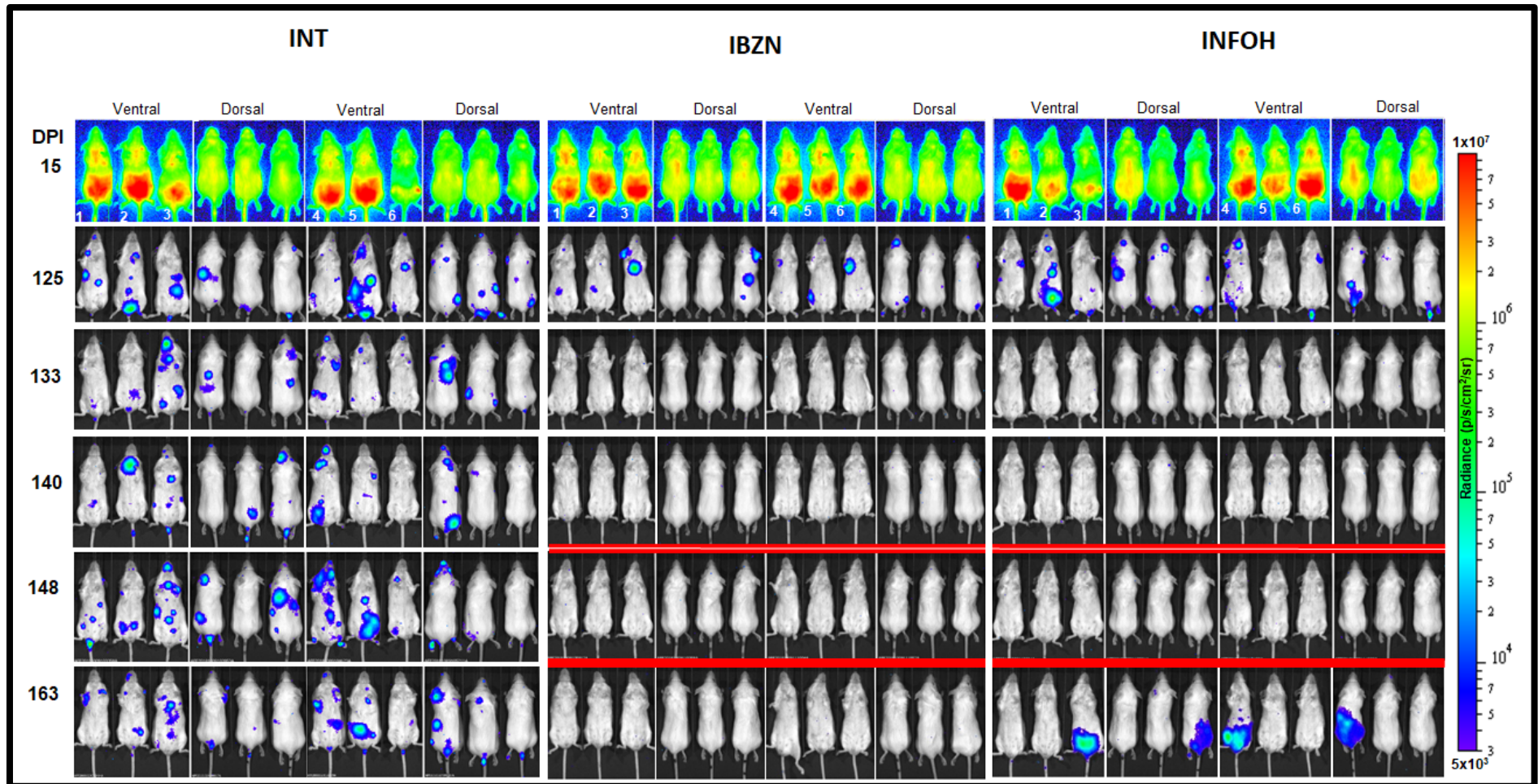


**Figura 67** - Experimento IV. Média e desvio padrão do peso relativo corporal dos camundongos Balb/c infectados com  $10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL Brener bioluminescente do *T. cruzi* (**INT**, **IBZN** e **INFOH**). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Linhas pontilhadas representam as doses de imunossupressor (ciclofosfamida 200 mg/kg).

Fonte: dados da pesquisa.

A parasitemia da fase crônica, utilizando cepas Brener CL bioluminescentes está mostrada na Figura 68. O grupo **INT** permaneceu com a parasitemia positiva para todos os animais até o final do protocolo (163dpi). O grupo tratado com **BZN** (133dpi), apresentou eliminação dos parasitas em 100% dos animais com cura após três doses de ciclofosfamida. Para o grupo tratado com **NFOH** (133dpi), observou-se eliminação dos parasitas em 100% dos animais analisados. Este valor foi sustentado

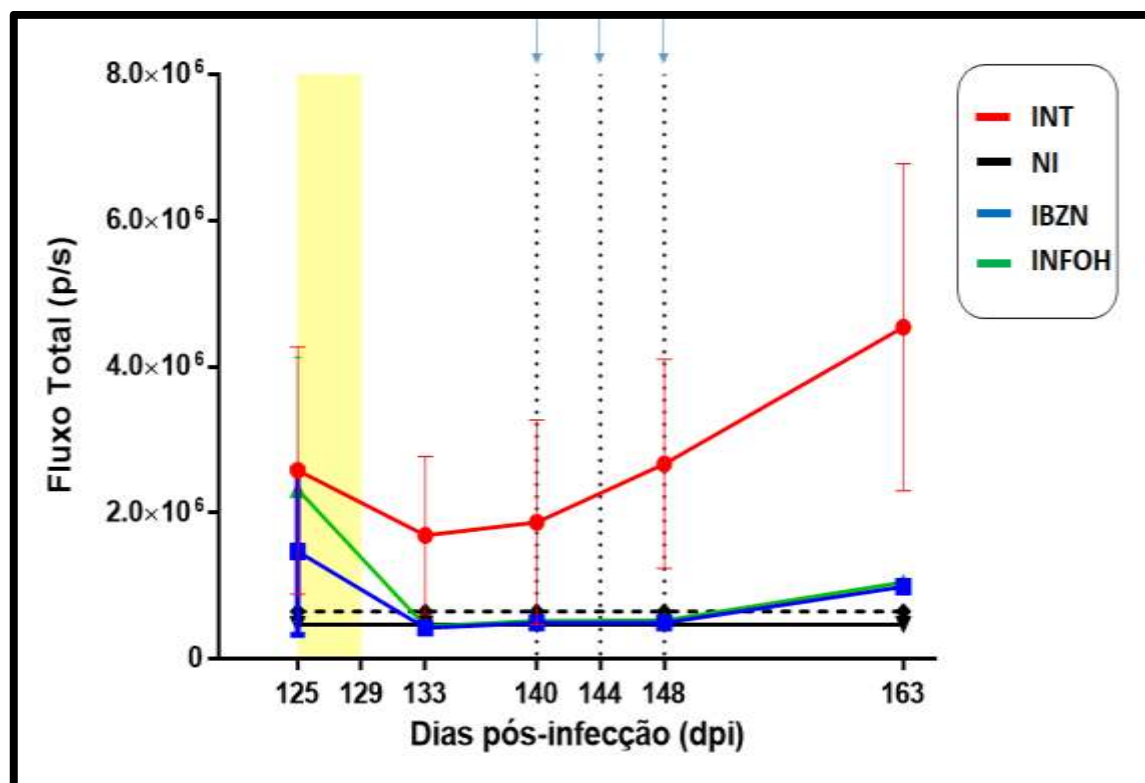
durante a primeira e a segunda dose de imunossupressão dos animais. No entanto, ao aplicar a terceira dose de ciclofosfamida (148dpi) 2 dos 6 animais voltaram à parasitemia, exibindo 66,66% de cura (163dpi) (Figura 68).



**Figura 68** - Parasitemia por imagens de bioluminescência de cada grupo foram observadas nos dias 15, 125, 133, 140, 148 e 163 dpi (dias pós infecção) em camundongos Balb/c inoculados com  $1 \times 10^3$  formas da cepa CL Brener luc bioluminescente de *T. cruzi* – Experimento IV. Linha vermelha representa o período de imunossupressor (ciclofosfamida 200) realizados nos dias 140, 144 e 148dpi. Período de tratamento: 125-129dpi.

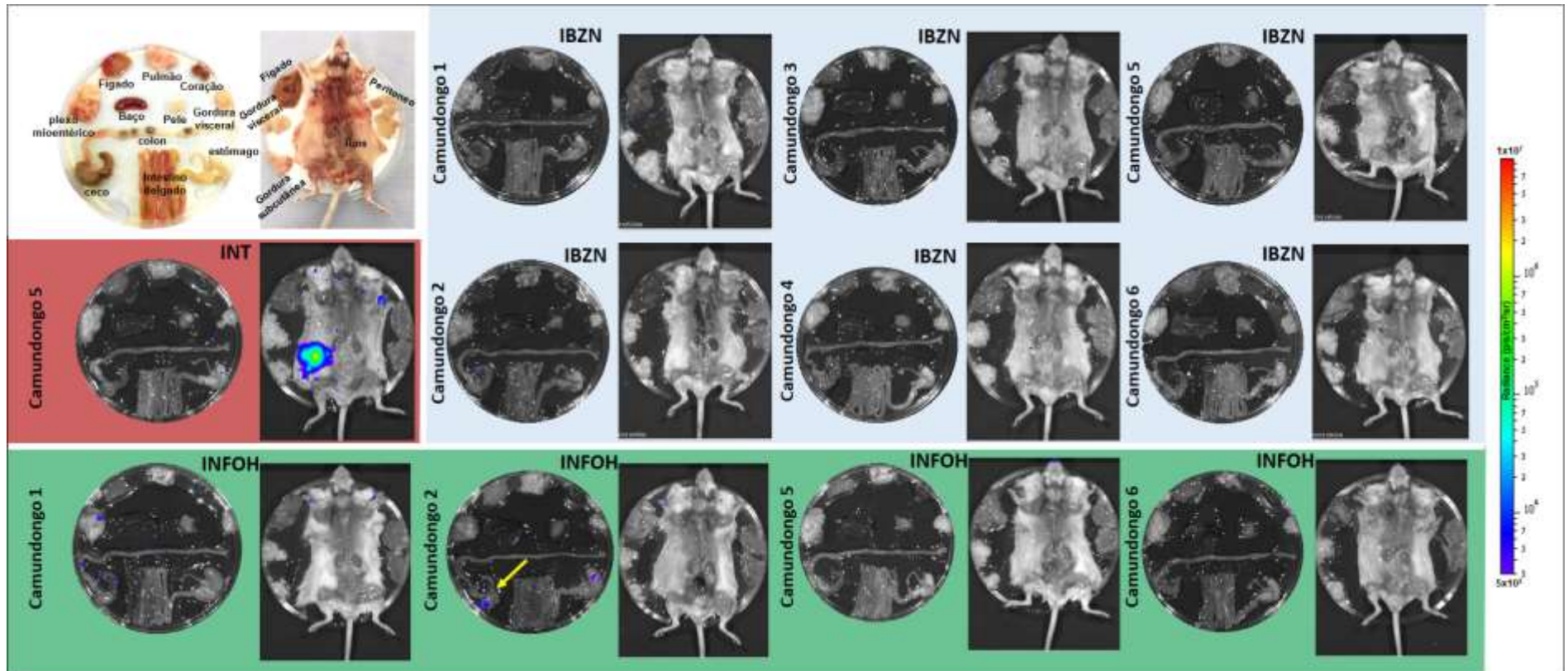
Fonte: dados da pesquisa.

O monitoramento da parasitemia foi realizado nos dias 15, 125, 133, 140, 148 e 163 dpi, e os valores obtidos em *fótons* por segundo (p/s) estão apresentados na Figura 69.



**Figura 69** - Parasitemia do experimento IV, expressados em valores de *fótons* por segundo (p/s). Área destacada em amarelo representa o período de tratamento (cinco dias). Seta azul (linha pontilhada) representa as doses de imunossupressor (ciclofosfamida 200 mg/kg).  
Fonte: dados da pesquisa.

Para análise *ex vivo*, utilizam-se apenas animais com parasitemia negativa durante a imunossupressão. Para o grupo **INT**, foi utilizado o camundongo número 5 como exemplo. No grupo **IBZN**, todos animais foram submetidos a análise *ex vivo*, sendo que todos apresentaram ausência de parasitismo. Para o grupo **INFOH**, os quatro animais apresentaram parasitemia negativa durante imunossupressão, foram submetidos a análise *ex vivo*, em que ¼ animais (camundongo 2) apresentou retrocesso parasitêmico durante esta análise, devido a isso, conclui-se 50% de cura para o **INFOH**, comparado a 100% do **IBZN** (Figura 70).



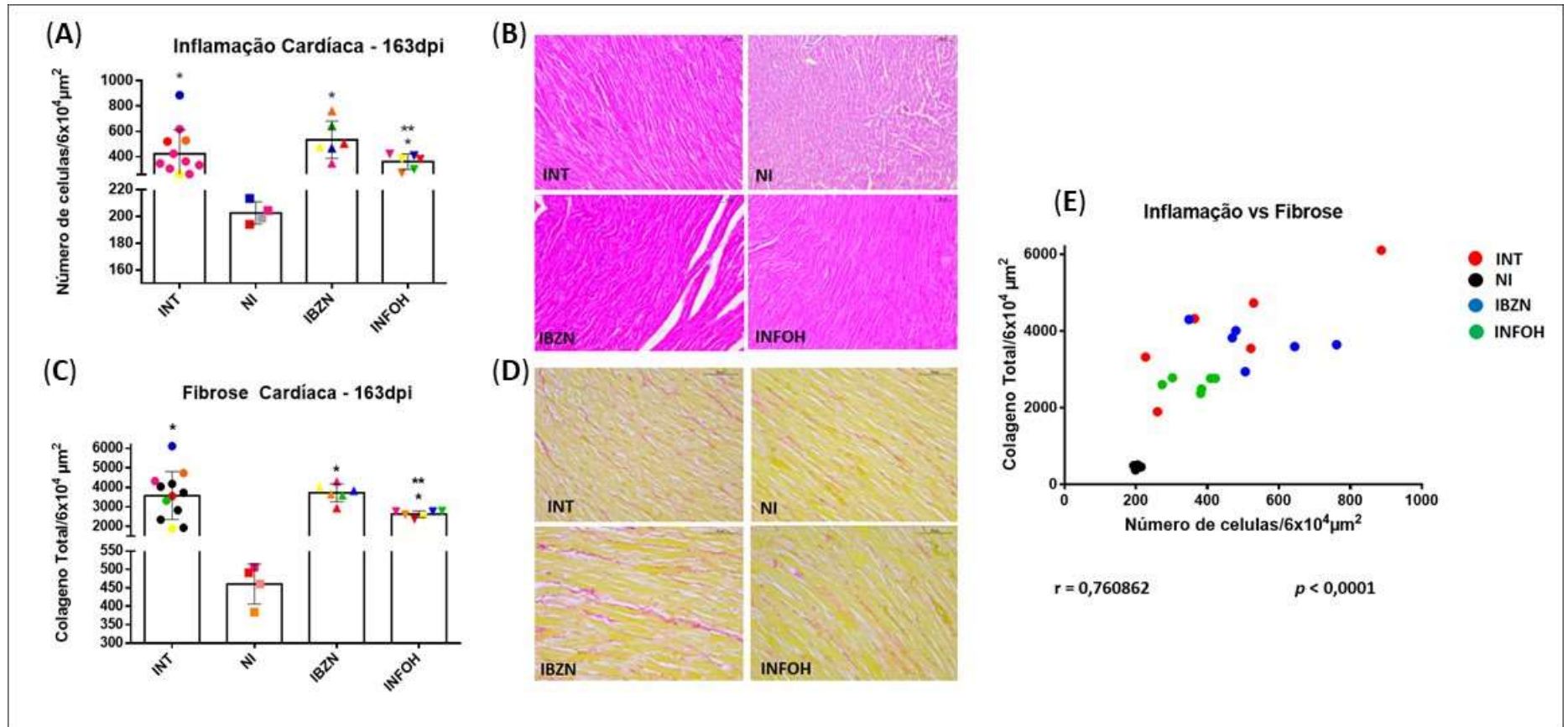
**Figura 70** - Análise ex vivo por imagem dos camundongos Balb/c (experimento IV).  
 Fonte: dados da pesquisa.



As análises histopatológicas de infiltrados inflamatórios cardíacos dos animais do experimento **IV** (fase crônica da doença de Chagas, CL-Brener luc bioluminescente) exibiram diferença estatística significativa entre todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) em relação ao grupo **NI** (Figura 71).

Com relação a presença de fibrose cardíaca, foi possível observar diferença estatística significativa entre todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**), comparado ao grupo **NI**, bem como foi identificado diferença estatística entre os grupos **IBZN** e **INFOH**, sendo o segundo com menor quantidade de colágeno total em relação ao primeiro (Figura 71).

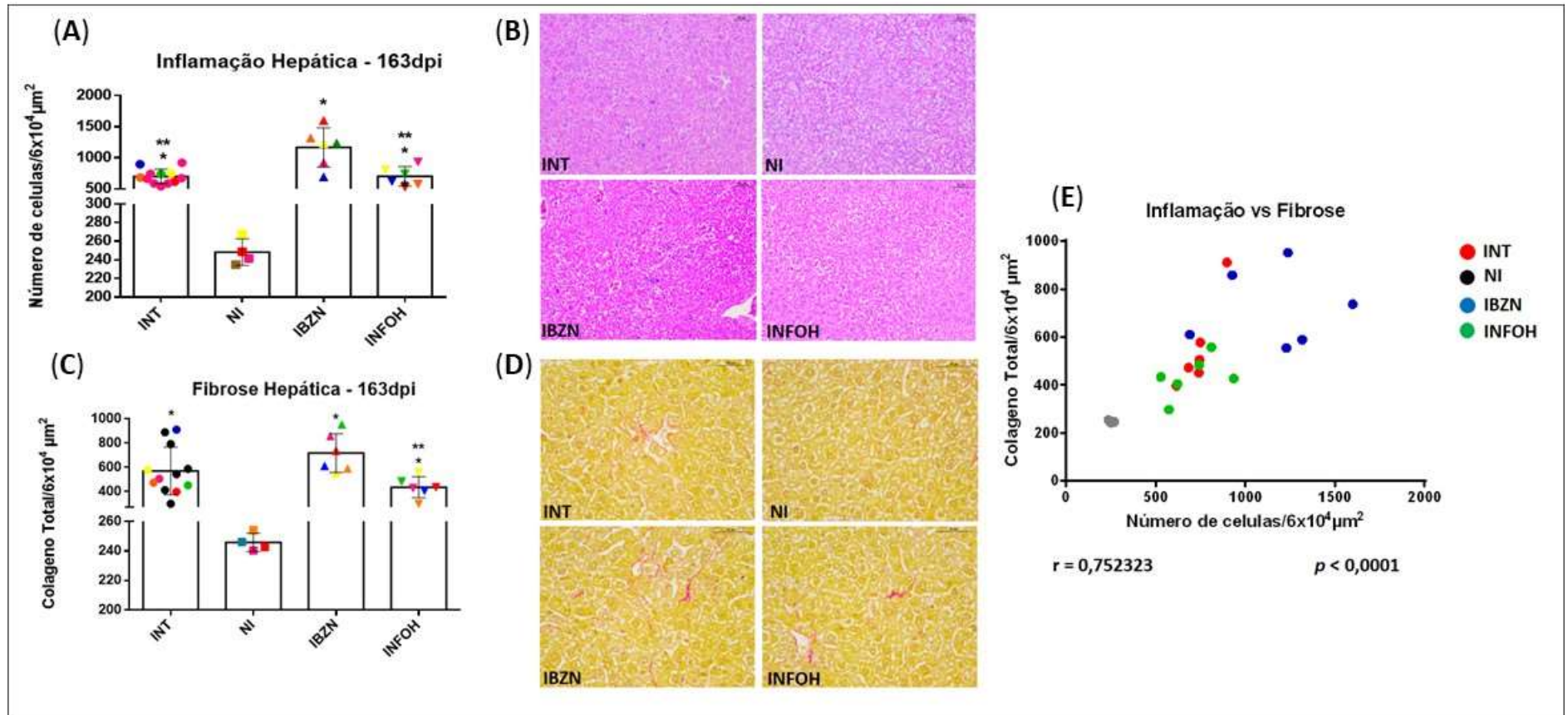
A fim de completar o estudo, realizou-se o teste estatístico de correlação de Pearson, o qual apresentou uma correlação positiva forte ( $r = 0,760862$ ;  $p = 0,0001$ ) entre a inflamação e a fibrose no coração dos animais do experimento **IV** (fase crônica da doença de Chagas) (Figura 71).



**Figura 71** - Resultados obtidos da análise histopatológica do coração dos animais do experimento **IV** em relação ao número de infiltrados inflamatórios (**A** e **B**, Hematoxilina e Eosina) e a quantidade total de colágeno (**C** e **D**, picrosiriusred); Correlação de Pearson (**E**) entre ambas as medidas. (\*): estatisticamente diferente do grupo **NI**. (\*\*): estatisticamente diferente do grupo **IBZN**.  
Fonte: dados da pesquisa.

As análises histopatológicas de inflamação hepática dos animais do experimento **IV** exibiram diferença estatística entre os todos os grupos infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) em relação ao grupo **NI** (Figura 72). Foi observada diferença estatística significativa entre os grupos **INT** e **INFOH** em relação ao grupo **IBZN**. O fígado dos animais infectados (**INT**, **IBZN** e **INFOH**) apresentou diferença estatística em relação ao grupo **NI** (figura 64). O grupo **INFOH** mostrou diferença estatística em relação ao grupo **IBZN**, sendo o último com maior quantidade de colágeno total hepático.

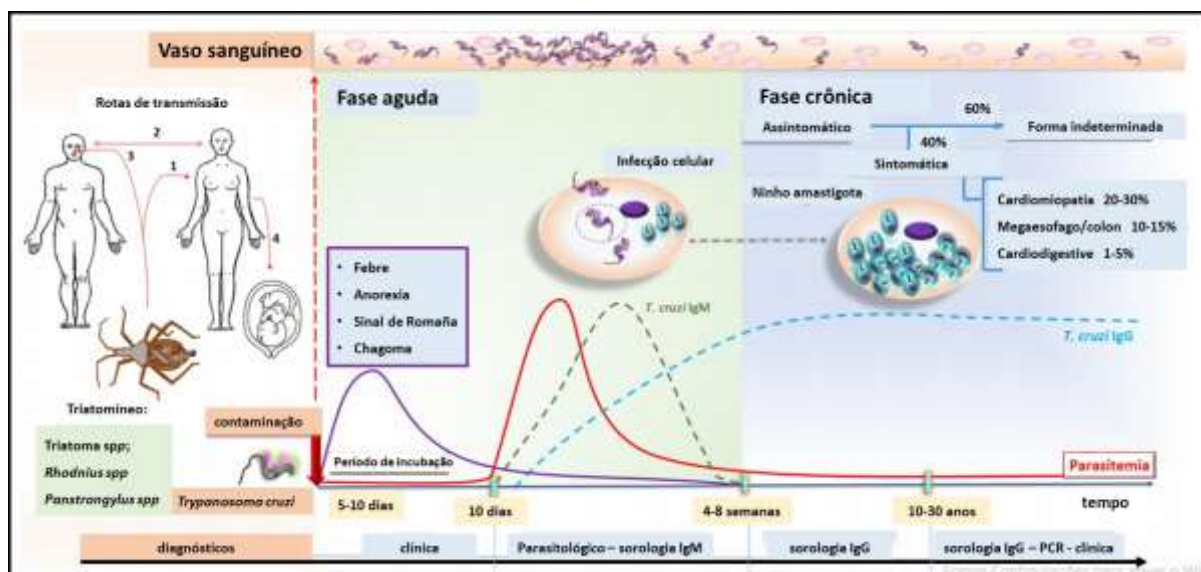
Após ambas as análises histopatológicas citadas, foi realizado o teste estatístico de correlação de Pearson, o qual exibiu uma correlação positiva fraca ( $r = 0,752323$ ;  $p = 0,0001$ ), comparando à inflamação e fibrose hepática dos animais do experimento **IV** (fase crônica da doença de Chagas) (Figura 72).



**Figura 72** - Resultados obtidos da análise histopatológica do fígado dos animais do experimento **IV** em relação ao número de infiltrados inflamatórios (**A** e **B**, hematoxilina e eosina) e a quantidade total de colágeno (**C** e **D**, picrosiriusred); Correlação de Pearson (**E**) entre ambas as medidas. (\*): estatisticamente diferente do grupo **NI**. (\*\*): estatisticamente diferente do grupo **IBZN**. Fonte: dados da pesquisa.

## 5. Discussão

O desenvolvimento de novos compostos contra a doença de Chagas, especialmente contra o estágio crônico, é de extrema importância uma vez que o tratamento, no Brasil, tem sido limitado apenas ao benznidazol, principalmente na fase aguda (DIAS *et al.*, 2009, 2016). Essa doença infecciosa tropical negligenciada é considerada um sério problema de saúde pública nos países endêmicos da América Latina, especialmente devido as dificuldades encontradas para demonstrar a cura estéril (total) do *T. cruzi* no organismo. Durante os últimos anos, mesmo com a tecnologia molecular baseado na extração e pesquisa do DNA do parasito (PCR), diagnósticos com falso-positivos para cura de pacientes chagásicos tem sido confundido por muitos médicos, que são incapazes de monitorar, minuciosamente, a infecção intra-celular durante a fase crônica. Os métodos de diagnósticos utilizados em cada fase da doença, bem como suas vantagens e desvantagens foram resumidos na Figura 73 e Tabela 10.



**Figura 73** – Resumo da doença de Chagas em humanos com sintomas e diagnósticos para ambos estágios (agudo e crônico).

Fonte: autor.

**Tabela 10** – Métodos comuns para detecção de *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros mamíferos, modelo experimental.

Método	Alvo	Vantagens	Desvantagens	Referências
<b>Sorologia</b>	Anticorpos anti- <i>T. cruzi</i>	- Simples; - Baixo custo; - Diagnóstico padrão.	- Indireta; - Qualitativa; - Leva muito tempo para soro-negativação em sujeitos curados.	MORILLO <i>et al.</i> , 2015; BHATTACHARYYA <i>et al.</i> , 2014; PORTELLA, ANDRADE, 2009.
<b>Exame de sangue fresco por microscopia (Parasitemia)</b>	Tripomastigotas vivos	- Definitivo; - Resultado rápido.	- Restrito, principalmente, à fase aguda da doença de Chagas; - Fase crônica apenas com uso de imunossuppressores.	CALDERÓN <i>et al.</i> , 2012.
<b>Hemocultura</b>	Tripomastigotas vivos	- Definitivo; - Baixo custo	- Muito tempo até o resultado; - Baixa sensibilidade.	SIRIANO <i>et al.</i> , 2011.
<b>Xenodiagnóstico</b>	Tripomastigotas metacíclicos vivos	- Definitivo; - Baixo custo.	- Muito tempo até o resultado; - Requer colônia de <i>Triatoma spp.</i>	SAAVEDRA <i>et al.</i> , 2016.
<b>Histopatologia</b>	parasitos fixos e intactos	- Parasitos vistos diretamente no tecido; - Morfologia e contexto patológico acessível.	- Baixa sensibilidade; - Viés de amostragem $\beta$ ; - Dados da captura instantânea.	CALDERÓN <i>et al.</i> , 2012.; BENVENUTI <i>et al.</i> , 2014; PEREIRA <i>et al.</i> , 2015.
<b>Imuno-histoquímica</b>	Antígeno do <i>T. cruzi</i>	- Mais sensível que a histologia de rotina; - Semiquantitativo; - Contexto morfológico e patológico disponível.	- É necessária uma otimização cuidadosa do sinal e do plano de fundo; - Viés de amostragem $\beta$ ; - Dados da captura instantânea.	BENVENUTI <i>et al.</i> , 2014; PORTELLA, ANDRADE, 2009.
<b>PCR</b>	DNA do <i>T. cruzi</i>	- Alta sensibilidade; - Limite mais baixo de detecção; - Pode ser quantitativo; - Alguns alvos permitem a discriminação dos subtipos de <i>T. cruzi</i> ( <i>TcI-TcVI</i> ).	- Viés de amostragem $\beta$ ; - Dados da captura instantânea; - Risco de contaminação ou amplificação inespecífica, gerando resultados falso-positivos.	LEWIS <i>et al.</i> , 2014; CURA <i>et al.</i> , 2015; BENVENUTI <i>et al.</i> , 2014;
<b>Imagem por bioluminescência / fluorescência</b>	Expressão do transgene em <i>T. cruzi</i> vivos.	- Permite avaliação serial; - Pode ser altamente sensível; - Viés mínimo de amostragem de tecido; - Detectados apenas <i>T. cruzi</i> vivos.	- Apenas modelos animais; - Alto custo; - Requer otimização da expressão do transgene.	LEWIS <i>et al.</i> , 2014, 2015, 2016; FRANCISCO <i>et al.</i> , 2015.

Fonte: autor.  $\beta$ Devido à variabilidade na distribuição dos focos de parasitas ao longo do tempo e entre os locais dos tecidos.

Nos experimentos **I** e **II**, utilizaram-se a curva de parasitemia (fase aguda e imunossupressão durante a fase crônica), xenodiagnóstico, histopatologia como métodos de detecção dos parasitos e os danos teciduais causados pelos mesmos. Para os experimentos **I** e **II**, o período considerado pré-patente foi de 5-7dpi, conforme previsto segundo a literatura (RIBEIRO, 2010, 2014; PINTO, *et al.*, 1986) bem como o pico parasitêmico de 7 a 21dpi. A fase aguda da doença, em ambos os experimentos **I** e **II**, durou cerca de 77 – 91dpi, para o grupo controle positivo, possivelmente devido ao baixo inóculo ( $1 \times 10^2$  formas tripomastigotas). De acordo com a literatura (BARRETTO *et al.*, 1965; BELDA NETO, *et al.*, 1973; BELDA NETO *et al.*, 1975, BARATA, *et al.*, 1988; PINTO, 2000; SCARIM *et al.*, 2018), independente da cepa utilizada no experimento, há uma ampla gama de instabilidade nos níveis parasitêmicos em animais, além disso a forma de infecção também influencia (gavage, i.p.). Estes dados foram observados tanto em seres humanos quanto em animais silvestres ou vetores (BARRETTO *et al.*, 1965; BELDA NETO, *et al.*, 1973; BELDA NETO *et al.*, 1975, BARATA, *et al.*, 1988; PINTO, 2000; SCARIM *et al.*, 2018)

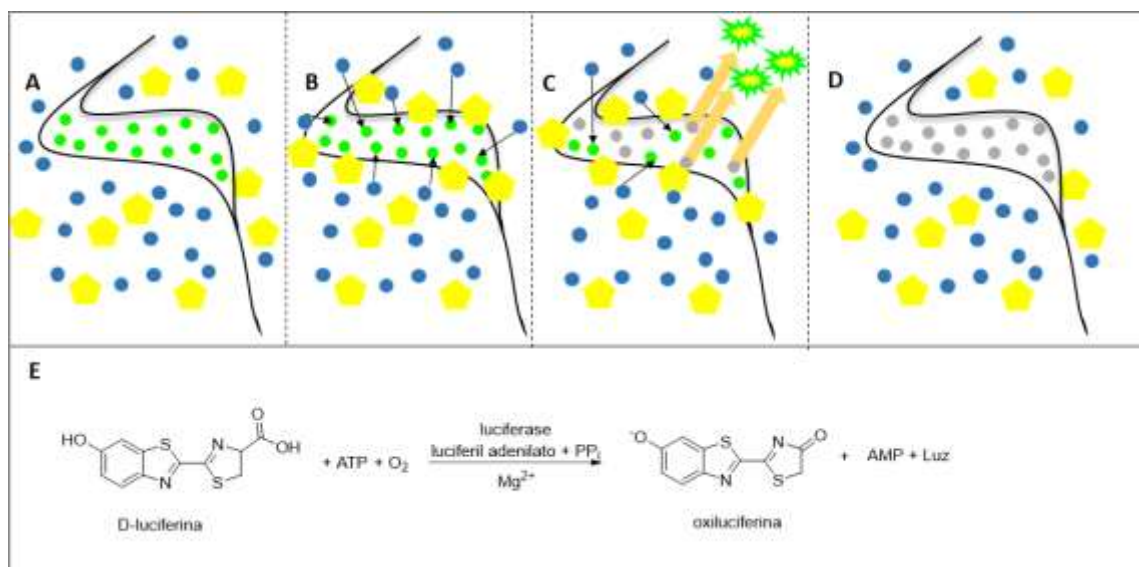
Os resultados de parasitemia na fase crônica com a cepa Bolívia após imunossupressão com dexametasona, no experimento **II**, foram similares aos apresentados por Scarim *et al.* (2018), que utilizaram cepa Y, com o mesmo período de tratamento com NFOH (150 mg/kg) e BZN (60 mg/kg) (60 dias) durante a fase crônica (indeterminada) da doença de Chagas. Houve reativação da parasitemia apenas no grupo infectado, sem tratamento.

Os ensaios de xenodiagnóstico e parasitemia direto possuem vantagens como: facilidade na visualização dos parasitos vivos (tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas) e baixo custo. As desvantagens são: demora para o resultado e necessidade de colônias de triatomíneos, no caso do xenodiagnóstico, e restrito para fase aguda, a não ser que ocorra indução de imunossupressão, no caso da parasitemia de sangue direto, além de ambas as técnicas analisarem apenas o sangue dos animais e não os tecidos (SAAVEDRA, *et al.*, 2016, LEWIS, *et al.*, 2016). Os resultados de xenodiagnóstico mostraram negativos e similares ao da parasitemia sanguínea (direta) nos grupos tratados com BZN e NFOH (experimento **II**), sugerindo que no período estudado, não havia parasitas circulantes após tratamentos.

Em estudo anterior, *in vivo*, fase crônica com cepa Y, Scarim *et al.* (2018) observaram a presença de ninhos amastigotas no coração, cólon, músculo esquelético e fígado do grupo controle positivo, e no coração e fígado do grupo tratado com BZN (60 mg/kg), e ausentes para os grupos tratados com NFOH (150 mg/kg), e não infectados, após um ciclo de imunossupressão com dexametasona (14 dias) (SCARIM *et al.*, 2018). Esses resultados foram expressos similarmente no presente trabalho, para a cepa Bolívia de *T. cruzi*, em que se observou a presença de ninhos amastigotas no coração, cólon, músculo esquelético e fígado do grupo controle infectado não tratado (**INT**) e no coração, músculo esquelético e cólon grupo tratado com BZN (**IBZN**, 60 mg/kg), e ausentes para os grupos tratados com NFOH (**INFOH**, 150 mg/kg), e não infectados (**NI**). Assim, 150 mg/kg/dia do composto NFOH demonstrou possuir a capacidade de diminuir as lesões inflamatórias e ninhos amastigotas das cepas Y e Bolívia, durante tratamento na fase crônica (indeterminada) da doença de Chagas em modelo animal.

Lewis e colaboradores (2014), da *London School of Hygiene and Tropical Medicine - University of London (Reino Unido, UK)* desenvolveram o método de avaliação de fármacos em modelo *in vivo* por imagem utilizando tripanossoma bioluminescente incorporado ao DNA de *T. cruzi*. Para tanto, parte do DNA de *Lampyridae spp* (vagalume), em que se induz a produção de luciferase pelos parasitos e ao injetar luciferina nos animais infectados por estes parasitos, ocorre uma reação de catalítica de oxigenação de luciferase (*T. cruzi*) e a luciferina (injetada), formando assim oxiluciferina e liberando luz (bioluminescência, Figorra 74).





**Figura 74** - Mecanismo de bioluminescência de *T. cruzi*, desenvolvimento para obtenção de novos fármacos e melhor compreensão da doença de Chagas. **(A)** *T. cruzi*, luciferase (enzima, círculo verde), oxigênio (círculo azul), D-luciferina (pentágonos amarelos); **(B)** D-luciferina na presença de oxigênio reage com a luciferase (enzima); **(C)** reação produz fótons de luz; **(D)** D-luciferina quando oxidada totalmente forma oxiluciferina; **(E)** reação química catalisada pela luciferase.

Fonte: autor.

Como parte do estágio sanduíche, os experimentos **III** e **IV** foram realizadas utilizando os métodos de detecção de imagem por bioluminescência e histopatologia, sendo a primeira técnica a mais indicada atualmente (maior tecnologia) para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas. Assim, a técnica permite a visualização dos *T. cruzi* em tempo real no organismo do animal. O mesmo grupo, do Prof. Dr. Kelly, passou a ser referência pelos órgãos como a Organização Mundial da Saúde (OMS) a o *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDI) para a pesquisa de fármacos em Doença de Chagas. O grupo preconiza doses de, no máximo, 100 mg/kg, independentemente da substância e utiliza cinco dias de tratamento e até três ciclos de imunossupressor com 200 mg/kg de ciclofosfamida. Assim, os candidatos a fármacos antichagásicos, independentemente da toxicidade inicial, devem ultrapassar essa barreira, pois a ação tripanomicida será observada em cinco dias de tratamento seguido de doses imunossupressoras.

O tratamento com NFOH (100 mg/kg), durante os experimentos **III** e **IV**, demonstrou capacidade de diminuir a parasitemia, em apenas cinco dias de tratamento, em ambas a fases da doença, sendo que foi apresentado maior eficácia durante a fase crônica da doença de Chagas, onde após três doses de

imunossupressão com ciclofosfamida (200 mg/kg), apenas 50% dos animais apresentaram reativação parasitêmica, somando parasitemia e análises *ex vivo*, comparados a 100% de reativação na fase aguda da doença de Chagas (com apenas duas doses de imunossupressão).

A imunossupressão é capaz de modificar o progresso natural da doença, pré-determinando o avanço ou a reativação de infecções oportunistas, especialmente a doença de Chagas (Da COSTA, 2000). Deste modo, a imunossupressão induzida farmacologicamente no modelo animal infetado com parasitos pode levar à reativação e conseqüentemente com a amplificação da parasitemia sanguínea, a que pode ser observada facilmente por um simples exame parasitológico de sangue direto mesmo assintomático, como na maioria dos casos.

Tanto as concentrações das substâncias, e ciclos de imunossupressão são variáveis, não tendo consenso na literatura (SCARIM *et al.*, 2018). Não há modelo padrão para o ensaio de fase crônica. Porém, apesar das várias publicações variarem de doses de BZN como padrão (60-100 mg/kg) (SCARIM *et al.*, 2018), os estudos contendo cepa Y e Bolívia envolvendo nosso grupo, basearam-se nos trabalhos de Davies e colaboradores (2010). A imunossupressão com dexametasona por 14 dias foi escolhida devido a um padrão mais real, sem debilitar o animal a ponto de provocar mortalidade. O objetivo desta etapa é provocar a reativação da parasitemia, durante a fase crônica, através da estimulação dos parasitas latentes e assim verificar a real cura. Nos estudos com cepa Y e Bolívia, a imunossupressão dos animais foram realizadas com apenas um ciclo de 14 dias consecutivos de tratamento com dexametasona (5 mg/kg/dia). Assim, a imunossupressão para o experimento III e IV com ciclofosfamida (200 mg/kg) foi realizada de acordo com Francisco *et al.* (2015, 2016), em três repetições. Ambos os tratamentos farmacológicos de imunossupressão, dexametasona (5 mg/kg – 14 dias) e ciclofosfamida (200 mg/kg três doses de quatro em quatro dias), foram eficientes para retrocesso parasitêmico, sendo diferentes, apenas, na posologia, concentrações de administração e valores comerciais.

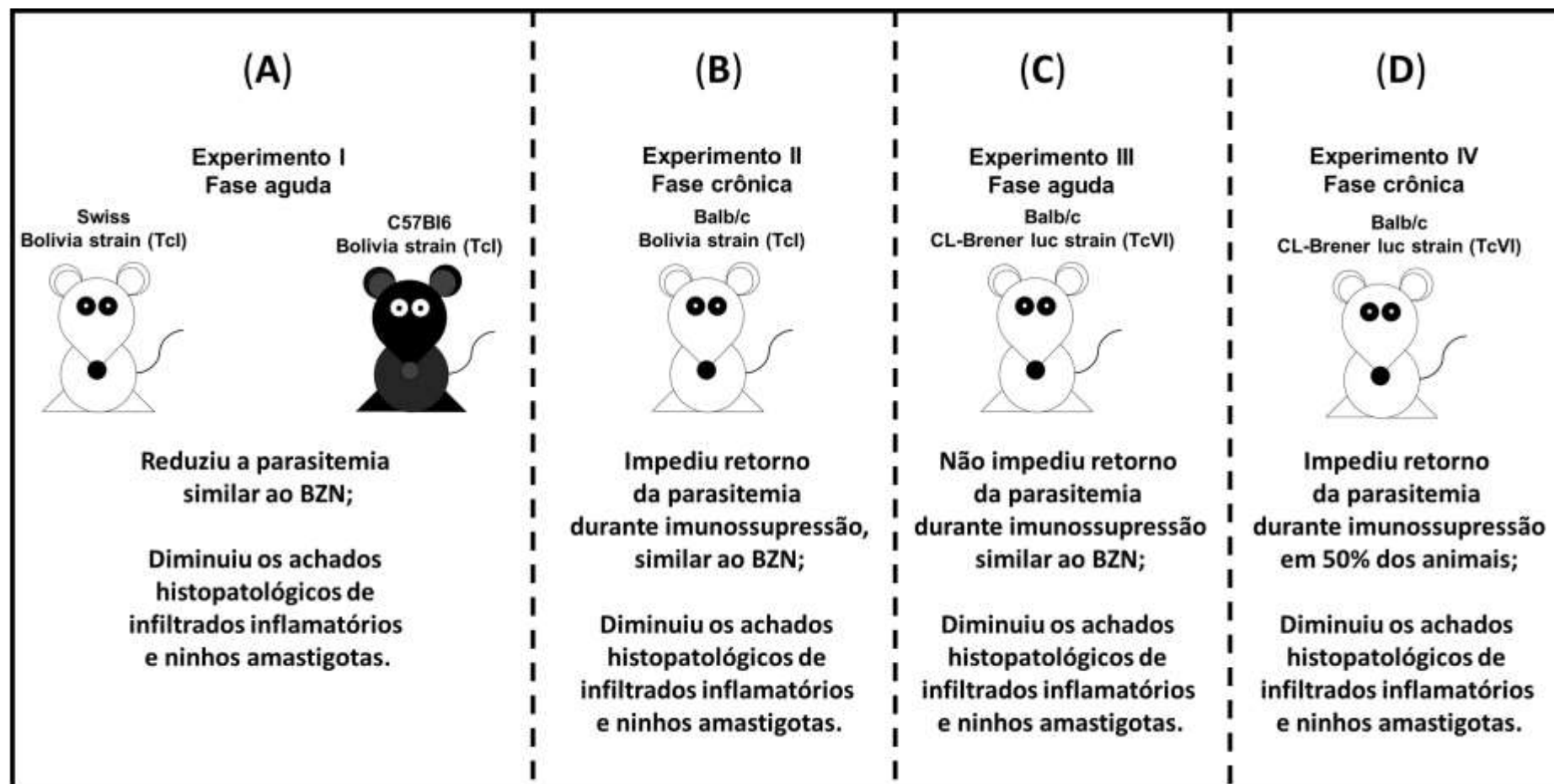
Em um estudo realizado com o composto NFOH, exibido por Davies *et al.* (2010), animais tratados por 60 dias com NFOH (150 mg/kg/dia) e eutanasiados 30 dias após tratamento obtiveram 90% de cura por meio de ensaio de PCR, e para os animais eutanasiados 180 dias após tratamento observou-se 100% de cura, resultados similares ao grupo tratado com BZN (60 mg/kg/dia).

Em 2015, pesquisadores realizaram um estudo com mais de 300.000 moléculas e apontaram o NFOH entre as cinco melhores, e por consequência o avaliaram em modelo animal agudo infectado pela cepa Brazil luc bioluminescente de *T. cruzi*. O tratamento foi realizado duas vezes ao dia (50 mg/kg/dia) durante, apenas, quatro dias, ou seja, entre os dias 4 – 7dpi. Os resultados exibiram eliminação dos parasitos em 78,5% dos animais. Logo, até o momento, o composto NFOH foi avaliado contra cinco diferentes linhagens de *T. cruzi*, bem como de camundongos, em ambos os estágios da doença de Chagas em modelo experimental, resultando, sempre, em diminuição dos níveis parasitêmicos extra e intracelulares, e redução de danos teciduais, especialmente musculares, causados pelo parasito. Além disso, foram observados menores danos teciduais em relação ao composto padrão (BZN), principalmente hepáticos. As análises de biomarcadores hepáticos confirmaram a toxicidade do composto BZN, e capacidade do NFOH em não aumentar os níveis de TGO e TGP, conforme já descrito na literatura (SCARIM, *et al.*, 2018). O BZN, quando administrado, sob as mesmas concentrações do NFOH (150 mg/kg/dia), no período de 21 dias e 60 dias de tratamento (DAVIES, *et al.*, 2014), exibiu um perfil mais agressivo ao tecido hepático, como já previsto com 60 mg/kg por Scarim *et al.* (2018).

Os experimentos I e II foram executados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP (UNESP). Em ambos protocolos utilizados no experimento I (Swiss e C57Bl6), os animais do grupo INFOH reduziram a parasitemia durante a fase aguda da infecção com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, com 20 dias de tratamento (150 mg/kg/dia<sup>-1</sup>), equivalente ao IBZN (100 mg/kg/dia). Além disso, foram observados a capacidade do grupo INFOH em diminuir os achados inflamatórios e ninhos amastigotas em todos os tecidos analisados (Figura 75). No experimento II, camundongos Balb/c foram infectados com a cepa Bolívia de *T. cruzi*, e tratados durante 60 dias (150 mg/kg/dia<sup>-1</sup>) na fase crônica da infecção experimental. Os resultados fundamentais foram o impedimento do retorno parasitêmico, pós-tratamento, durante período de imunossupressão em ensaios de parasitemia (sangue fresco) e xenodiagnóstico. Da mesma forma que no experimento I, o grupo INFOH foi capaz de reduzir os danos e parasitos teciduais (Figura 75).

Os experimentos III e IV foram realizados na LSHTM em camundongos Balb/c infectados com a cepa CL-Brener luc bioluminescente de *T. cruzi* em ambos os

estágios da doença. O experimento **III** mostrou que o grupo INFOH não foi eficiente com cinco dias de tratamento ( $100 \text{ mg/kg/dia}^{-1}$ ), após imunossupressão durante a fase aguda experimental, no entanto, foi capaz de reduzir os infiltrados inflamatórios em análise histopatológica (Figura 75). Para o experimento **IV**, o grupo INFOH exibiu cura estéril em 50% dos camundongos tratados durante a fase crônica por apenas cinco dias ( $100 \text{ mg/kg/dia}^{-1}$ ), mesmo após imunossupressão. Além disso, o grupo INFOH foi capaz de reduzir os achados inflamatórios (Figura 75).



**Figura 75** – Resumo dos principais resultados do tratamento com NFOH observados nos experimentos I-IV.

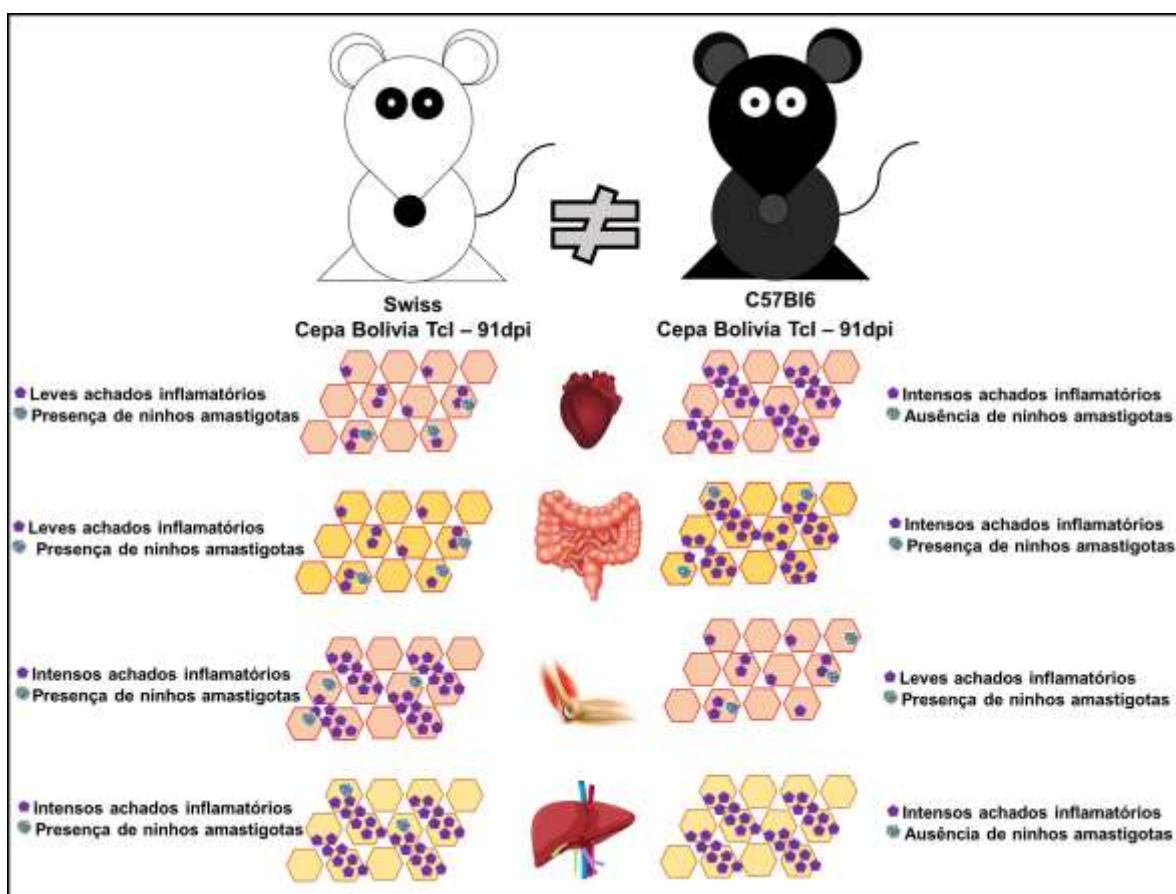
Fonte: dados da pesquisa.

Estudos experimentais em camundongos de diferentes linhagens é de suma importância para a compreensão do mecanismo fisiopatológico de *T. cruzi* em diferentes modelos animais (FRANCISCO *et al.*, 2016; LEWIS *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018). Além disso, o uso de diferentes cepas de *T. cruzi* é necessária, uma vez que existe uma enorme variedade dessas, com diferentes características moleculares, e, conseqüentemente, distintas respostas aos compostos candidatos e/ou fármacos (FRANCISCO *et al.*, 2016; LEWIS *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018).

Neste estudo, especificamente no experimento I, observou-se, claramente, a diferença histopatológica dos grupos controles infectados não tratados (**INT**) em diferentes linhagens de camundongos (Swiss e C57bl6) infectados com a cepa Bolívia ( $10^2$  formas). Identificou-se que os camundongos Swiss eutanasiados no dia 91 pós infecção (dpi) apresentaram ninhos amastigotas no coração, músculo esquelético, cólon e fígado, bem como inflamações leves e intensas. Para os camundongos C57Bl6, eutanasiados no dia 91dpi, foram encontrados achados de ninhos amastigotas no músculo esquelético e cólon, bem como intensas reações inflamatórias no coração, cólon e fígado, exceto para o músculo esquelético. Portanto, o experimento I aponta os camundongos Swiss (**INT**) com leves achados histopatológicos inflamatórios e ampla presença de ninhos amastigotas, e para os camundongos C57Bl6 (**INT**) intensas áreas com infiltrados inflamatórios e raros ninhos amastigotas (Figura 76). Por outro lado, quando utilizado cepas diferentes de *T. cruzi*, cepa Bolívia (experimento II) e CL-Brener luc (experimento IV), na mesma linhagem de camundongo (Balb/c), foram observadas alterações fisiopatológicas diferentes nos animais infectados não tratados (**INT**). A eutanásia realizada em dias similares (161 e 163dpi, experimentos II e IV) exibiu intensas reações inflamatórias para ambas as cepas utilizadas, no entanto, a presença de ninhos amastigotas foi observada apenas no grupo infectado não tratado (**INT**) da cepa Bolívia (Figura 77).

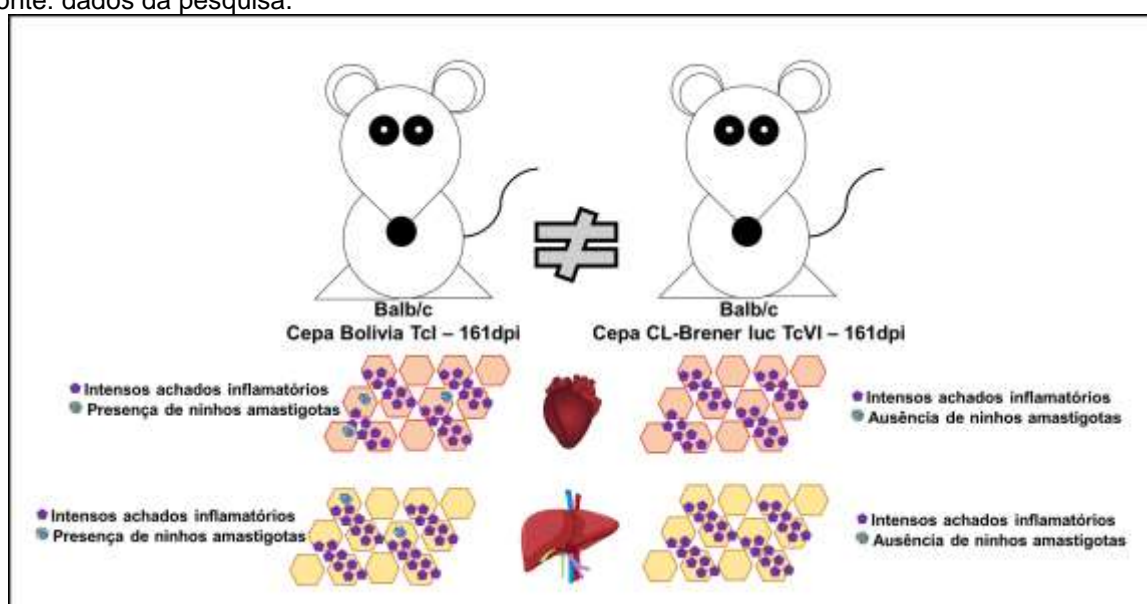
Assim, devido as diferenças em diversas linhagens de camundongos e distintas subfamílias de *T. cruzi* (TcI e TcVI) utilizadas nos quatro protocolos (experimentos I-IV) apresentados neste estudo, torna-se este trabalho ainda mais importante para a comunidade acadêmica, principalmente no campo da doença de Chagas experimental. Além disso, o candidato a fármaco, NFOH, está seguindo todos estes critérios de diferentes animais e variedades de cepas de *T. cruzi* em ambos estágios da doença, exigidos e aconselhados, por órgãos como DNDi e

instituições como *LSHTM*, para que assim, em um futuro próximo, seja utilizado em ensaios clínicos.



**Figura 76** - Achados histopatológicos em diferentes camundongos (Swiss e C57Bl6) com mesma cepa (Bolivia) de *T. cruzi*. Grupos infectados não tratados (INT), experimento I.

Fonte: dados da pesquisa.



**Figura 77** - Achados histopatológicos em diferentes camundongos com mesma cepa de *T. cruzi* (cep Bolivia). Grupos infectados não tratados (INT), experimento II e IV.

Fonte: dados da pesquisa.

Em um estudo utilizando o mesmo protocolo dos experimentos III e IV (fase aguda e crônica da doença de Chagas), cepa CL Brener luc bioluminescente de *T. cruzi*, Francisco *et al.* (2015) avaliaram a capacidade do composto posaconazol (20 dias de tratamento: 20 mg/kg/dia), em que os resultados apontaram ineficácia do composto (0% de cura) na fase crônica e 15,8% de cura na fase aguda, comparados com 100% de cura do BZN (100 mg/kg/dia) na fase aguda com 20 dias de tratamento e na fase crônica com 5, 10 e 20 dias de tratamento.

O mesmo grupo inglês da LSHTM, um ano após o estudo com o posaconazol (FRANCISCO *et al.*, 2016), realizou um estudo um pouco mais complexo, no entanto, agora, utilizando o composto fexinidazol e seu sal (e também um metabólito) o sulfonato de fexinidazol, com o mesmo modelo agudo e crônico, os resultados apontaram cura total dos animais tratados com fexinidazol e sulfonato de fexinidazol 100 mg/kg/dia durante cinco dias de tratamento na fase crônica; e a mesma concentração (100 mg/kg/dia) durante 10 dias para o fexinidazol e cinco dias para sulfonato de fexinidazol, durante fase aguda. O fexinidazol apresentou 67% de cura em cinco dias de tratamento na fase aguda (FRANCISCO *et al.*, 2016). Desta forma, o posaconazol foi substituído pelo fexinidazol no portfólio do DNDi como potencial fármaco antichagásico. Recentemente, a agência europeia de Medicamentos aprovou o fexinidazol como o primeiro tratamento, exclusivamente oral, contra *tripanossomíase africana humana* (TAH) - doença do sono (DNDI, 2019).

Apesar do BZN ser considerado fármaco ativo para a fase crônica, o mesmo não se observa na prática clínica e até o momento, não há no portfólio do DNDi ou no *Clinical Trials*, estudos envolvendo aumento da dose de BZN em humanos, devido à sua toxicidade. O último trabalho considerado como “novo”, foi a formulação pediátrica de BZN, em que a diferença para o BZN padrão (100 mg) é na concentração posológica de cada comprimido (12,5 mg). Dessa forma, até o momento, desde a obtenção de BZN, em 1970, não há outra alternativa farmacológica para tratar a doença de Chagas no Brasil.

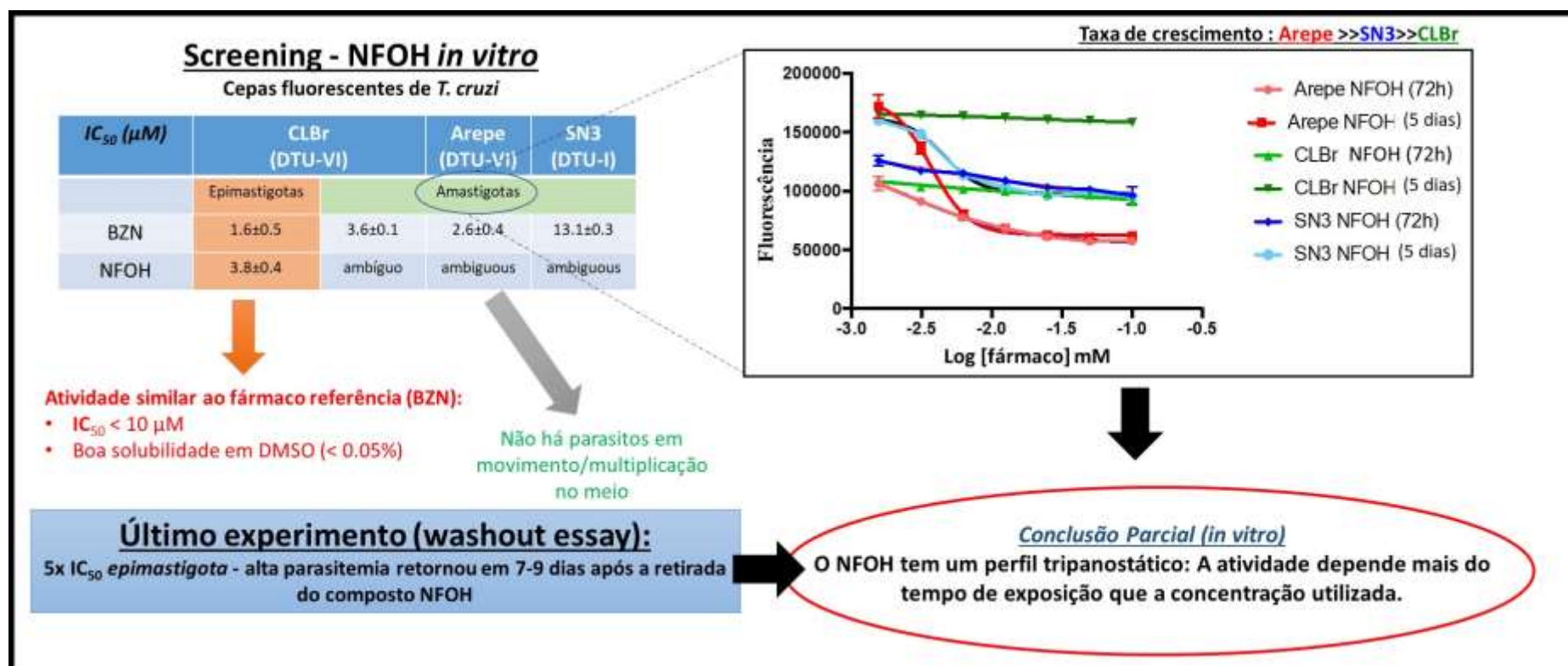
Os dados de efeitos adversos e perda de peso observados neste trabalho, basicamente nos quatro experimentos, foram confirmados por CASTRO E DIAZ (1988) que observaram efeitos adversos do BZN durante tratamento clínico em pacientes na fase aguda e crônica da doença de Chagas, tais como anorexia e perda de peso corpóreo, náuseas e vômitos, excitação nervosa, insônia, depressão



psique, convulsões, vertigem, dor de cabeça, sonolência, mialgias, artralgias, perda de equilíbrio, desorientação, esquecimento, parestesias, adinamia.

No experimento II, os resultados das análises dos biomarcadores hepáticos confirmaram a toxicidade do BZN e a capacidade do NFOH em não aumentar os níveis plasmáticos de TGO e TGP, conforme já descrito na literatura (DAVIES *et al.*, 2014, SCARIM *et al.*, 2018). O BZN, quando administrado, sob as mesmas concentrações do NFOH ( $150 \text{ mg/kg/dia}^{-1}$ ) nos períodos 21 e 60 dias de tratamento (DAVIES *et al.*, 2014), exibiu um perfil agressivo ao tecido hepático (alta toxicidade), como já previsto com  $60 \text{ mg/kg/dia}^{-1}$  durante 60 dias de tratamento (SCARIM *et al.*, 2018).

Em experimentos *in vitro* (*High Throughput Screening, HTS* - dados não mostrados), realizados na LSHTM durante o estágio sanduíche, o candidato antichagásico NFOH ( $\text{IC}_{50} = 3,8 \mu\text{M}$ ) mostrou atividade similar ao fármaco referência, o benznidazol (BZN,  $\text{IC}_{50} = 1,6 \mu\text{M}$ ), em relação às formas epimastigotas (CL Brener luc bioluminescente), além de boa solubilidade em DMSO ( $< 0,05\%$ ) (Figura 78). A atividade exibida pelo NFOH contra formas amastigotas (três diferentes cepas: CL Brener bioluminescente, SN3, Arepe de *T. cruzi*), além do ensaio utilizando cinco vezes a concentração de  $\text{IC}_{50}$  em epimastigotas, mantidos por cinco dias paralisou o crescimento parasitário, no entanto, ao retirar o composto do meio de cultura, cerca de sete a nove dias após a retirada do NFOH os parasitos voltaram a atividade (Figura 78). Deste modo, o ensaio de HTS demonstrou que o composto NFOH tem um perfil de fármaco tripanostático, ou seja, sua ação depende mais do tempo de exposição do composto do que a concentração utilizada. Portanto apresentou um comportamento diferente contra formas amastigotas em relação ao BZN. A mesma ação foi identificada por Arantes *et al.*, (2011), sendo a desferroxamina capaz de reduzir parasitemia e mortalidade em camundongos infectados com *T. cruzi* por propriedades tripanostáticas do que tripanocidas, resultados estes que complementam e ajudam a compreender os demais experimentos (I – IV) realizados neste trabalho.



**Figure 78** - Screening e "Washout essay" *in vitro* do composto NFOH em cepas fluorescentes de *T. cruzi*.

Fonte: Autor.

A comprovação de que 100 mg/kg de NFOH (cinco dias de tratamento) é capaz de curar 50% dos animais infectados com *T. cruzi*, cepa Brener CL bioluminescente em fase crônica, com três ciclos de imunossupressão com ciclofosfamida (200 mg/kg), mostra que nosso grupo se encontra no caminho certo, sendo um dado extremamente promissor, principalmente por causa dos efeitos não tóxicos, não mutagênico e não hepatotóxico (SCARIM, *et al.*, 2018; DAVIES, *et al.*, 2014; MACHADO, 2013; BOSQUESI, 2009; MELO, 2006; GUIDO, *et al.*, 2001). Protocolos de tratamento mais extensos deveriam ser aceitos e também preconizados nos laboratórios de excelência, tendo em vista de que o fato da cura em fase crônica observada pelo BZN nos animais na dose de 100 mg/kg por 5 dias não se observa na prática clínica, em que é utilizada a dose de 10mg/kg em adultos, por 60-90 dias e tratamento.

Assim, no sentido de atender os órgãos que determinam os protocolos, a busca posterior é melhorar a biodisponibilidade do NFOH, com derivados solúveis, ativos e não tóxicos, além de realizar estudos envolvendo a associação de BZN e NFOH, como sugerido, recentemente, pela literatura (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Os ensaios realizados com o candidato a fármaco NFOH, em diferentes modelos animais, comparando com os resultados obtidos neste trabalho estão resumidos na Tabela 11.

**Tabela 11** – Resumo de todos os estudos *in vivo* realizados com NFOH. (-) não realizado; (ND) não determinado.

Cepa de <i>T. cruzi</i>	Camundongos	Inóculo	Início tratamento (dia pós infecção)	NFOH (mg/kg/day)	Tratamento (período)	imunossupressão	Resultados			Referências
							Parasitêmia (reativação)	PCR, ou teste sorológico	Ninhos amastigotas (presença)	
Tulahuen	Swiss	10 <sup>3</sup>	5	150	60	-	ND	90% cura: 30 dias após tratamento	ND	DAVIES <i>et al.</i> , 2010
Tulahuen	Swiss	10 <sup>3</sup>	5	150	60	-	ND	100% cura: 180 dias após tratamento	ND	
Brazil luc <sup>α</sup>	Balb/c	10 <sup>5</sup>	3	50 <sup>#</sup>	5	-	Positivo para 21,5% 78,5% de cura (bioluminescência)	ND	ND	EKINS <i>et al.</i> , 2015
Y	Balb/c	10 <sup>2</sup>	49	150	60	Dexametasona 5 mg/kg por 14 dias consecutivos	negativo	ND	negativo	SCARIM <i>et al.</i> , 2018
Bolívia	Balb/c	10 <sup>2</sup>	91	150	60	Dexametasona 5 mg/kg por 14 dias consecutivos	negativo	ND	negativo	SCARIM <i>et al.</i> , 2020 (dados não publicado)
Bolívia	Swiss	10 <sup>2</sup>	5	150	20	-	negativo	ND	negativo	SCARIM <i>et al.</i> , 2020 (dados não publicado)
Bolívia	C57Bl6	10 <sup>2</sup>	5	150	20	-	negativo	ND	negativo	SCARIM <i>et al.</i> , 2020 (dados não publicado)
CL-Brener luc <sup>α</sup>	Balb/c	10 <sup>4</sup>	14	100	5	Ciclofosfamida uma dose a cada quatro dias (200mg/kg) – duas doses	Positivo para 100% 0% de cura (bioluminescência)	ND	negativo	SCARIM <i>et al.</i> , 2020 (dados não publicado)
CL-Brener luc <sup>α</sup>	Balb/c	10 <sup>4</sup>	125	100	5	Ciclofosfamida uma dose a cada quatro dias (200mg/kg) – três doses	Positivo para 50% 50% de cura (bioluminescência)	ND	negativo	SCARIM <i>et al.</i> , 2020 (dados não publicado)

Fonte: autor.

## 6. Conclusões

- Em ensaio agudo, animais inoculados com cepa Bolivia tanto em camundongos Swiss como C57Bl6 mostraram resultados semelhantes, eliminando a parasitemia após o tratamento com **NFOH** (150 mg/kg) ou **BZN** (100 mg/kg) por um período de 20 dias, diferenciando-se apenas no tempo para eliminar os parasitos. O BZN leva 11dpi enquanto o **NFOH**, 13dpi para os camundongos Swiss e 13dpi para o **BZN** e 15dpi para o **NFOH** nos camundongos C57Bl6. Além disso, o NFOH foi capaz de diminuir os infiltrados e ninhos amastigotas durante análise histopatológica.
- Em ensaio de atividade *in vivo* de fase crônica (cepa Bolivia), 60 dias de tratamento com **NFOH** (150 mg/kg) foi capaz de impedir a reativação da parasitemia após um ciclo de imunossupressão com dexametasona (14 dias – 5 mg/kg). Foi capaz, também, de diminuir os achados inflamatórios calcificação distrófica, necrose e ninhos amastigotas em todos os órgãos analisados em relação aos demais grupos infectados (**controle positivo** e **BZN**), sendo assim, para este ensaio, o NFOH é superior ao composto **BZN** (60 mg/kg), devido a diminuição de danos teciduais. No demais o NFOH foi capaz de reduzir os infiltrados inflamatórios e ninhos amastigotas durante análise histopatológica.
- Em modelo de fase aguda utilizando cepa Brener CL bioluminescente, o tratamento com **NFOH** (100 mg/kg/ 5 dias) não foi capaz de suprimir os parasitas. Entretanto, após o primeiro ciclo de imunossupressão com ciclofosfamida (200 mg/kg), cinco animais de seis foram negativados. No segundo ciclo de imunossupressão houve reativação em 100% dos animais, resultado similar ao **BZN** (100 mg/kg/ 5 dias). A análise histológica mostrou que o **NFOH** reduziu a fibrose cardíaca em relação ao controle positivo e **BZN** bem como a quantidade de infiltrados inflamatórios no fígado, valores significativamente diferentes do **BZN** demonstrando que o **NFOH** é menos tóxico que o **BZN**.
- Em modelo de fase crônica utilizando cepa Brener CL bioluminescente, o tratamento com **NFOH** (100 mg/kg), exibiu 100% de cura dos animais, mantendo-se inalterado após dois ciclos de imunossupressão com ciclofosfamida (200 mg/kg). Após o 3º ciclo, houve reativação em dois dos

seis animais analisados, confirmando 50% de cura pelo ensaio *ex vivo*. O **BZN** (100mg/kg), no mesmo protocolo, demonstrou 100% de cura. Na análise histopatológica, o **NFOH** reduziu o número de infiltrados inflamatórios e fibrose cardíaca e no tecido hepático foi capaz de reduzir a quantidade de infiltrados inflamatórios e colágeno total valores significativamente diferentes do **BZN**, demonstrando, que **NFOH** é menos tóxico que o **BZN**.

## 7. REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n. 2, p. 381-382, 2009.

AMBRÓSIO, D. L.; BARBOSA, C. F.; VIANNA, V. F.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: establishment of permeable cells for RNA processing analysis with drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 617-620, 2004.

ANDERSSON, J.; SUNNEMARK, A. O. D. Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. **Immunology Letters**. v. 86, n. 2, p. 207-212, 2003.

ANDRADE, A.L.; ZICKER, F.; DE OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA SILVA, S.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C.; DE ANDRADE, S. S.; DE ANDRADE, J. G.; MARTELLI, C. M. Randomized trial of efficacy of benznidazole treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v.348, n. 9039, p.1407-1413, 1996.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Baiano: Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65 - 121, 1974.

ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p. 27 - 35, 1997.

ANDRADE, S. G.; CARNEIRO, A. F.; SOUZA, A. J. M.; LIMA, E. S.; ANDRADE, Z. A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Internation Journal of Experimental Pathology**, v. 78, n. 6, p. 391 – 399, 1997.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. Doença de Chagas. In: SCHECHTER, M e MARANGONI, DV. **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 221-226. 1998.

ANDRADE, Z. Patologia da Doença de Chagas. In: ANDRADE, Z.A.; BRENER, Z; BARRAL NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 379-388. 2000.

ANONYMUS. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999.

ARANTES, J. M.; **Efeitos da desferrioxamina sobre aspectos parasitológicos, bioquímicos e imunológicos durante o curso da infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte/MG, 2011.

BAHIA, M. T.; DINIZ, L. D. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–1237, 2014.

BARATA, J. M. S.; ROCHA, R. M.; RODRIGUES, V. L. C. C.; FERRAZ FILHO, A. N. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase Americana do Estado do Acre (Brasil) e sua relação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 401 – 410, 1988.

BARBOSA, C. F.; OKUDA, E. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. M. B. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 40, n. 1, p. 33-39, jan. 2007.

BARBOSA, A. J.; QUEIROZ, D. M.; NOGUEIRA, A. M.; ROQUETTE REIS, M. J.; MENDES, E. N., ROCHA, G. A., ROMANELLOI, L. M. F.; TRONCONI, L. E. A. Chronic gastritis and *Helicobacter pylori* in digestive form of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; v. 35. n, 2. p. 117-121. 1993.



BARRETO, M. P. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.7, n. 5, p. 305 - 315, 1965.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 2003.

BELDA NETO, F. M. **Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. 1973.** 76 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, Unesp, Araraquara, 1973.

BELDA NETO, F. M. Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, p. 27-36, 1974.

BELDA NETO, F. M.; RIBEIRO, R. D.; BARRETO, M. P. Considerações sobre as características da infecção de camundongos inoculados com formas amastigotas ou flageladas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, n. 3, p. 137 - 142, 1975.

BENVENUTI, L. A.; ROGGÉRIO, A.; NISHIYA, A. S.; CAMPO, S. V.; FIORELLI, A. L.; LEVI, J. E. *Trypanosoma cruzi* persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 33, n. 7, p. 698-703, 2014.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; RASSI, A. JR.; MARIN-NETO, J. A.; DANTAS, R. O.; MAGUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. V.; GILMAN, R. H.; REYES, P. A.; SALVATELLA, R.; MOORE, A. C. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.

BERN, C.; VERASTEGUI, M.; GILMAN, R. H.; LAFUENTE, C.; GALDOS-CARDENAS, G.; CALDERON, M.; PACORI, J.; ABASTOFLOR, M. C.; APARICIO, H.; BRADY, M. F.; FERRUFINO, L.; ÂNGULO, N.; MARCUS, S.; STERLING, C.; MAGUIRE, J. H. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolívia. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 11, p. 1667–1674, 2009.

BERN, C.; MARTIN, D.L.; GILMAN, R.H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 19–47, 2011.

BHATTACHARYYA, T.; FALCONAR, A. K.; LUQYETTI, A. O.; COSTALES, J. A.; GRIJALVA, M. J.; LEWIS, M. D.; MESSENGER, L. A.; TRAN, T. T.; RAMIREZ, J. D.; GUHL, F.; CARRASCO, H. J.; DIOSQUE, P.; GARCIA, L.; LITVINOV, S. V.; MILES, M. A. Development of Peptide-Based Lineage-Specific Serology for Chronic Chagas Disease: Geographical and Clinical Distribution of Epitope Recognition. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2892, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Descrição da Doença de Chagas**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-Chagas/12-doenca-deChagas/11113-descricao-da-doenca-de-Chagas>>. Acesso em: 02 de março de 2020.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.55-56,

BRENER, Z.; CANÇADO, J. R. Terapêutica. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 362-424.

BRENER, Z.; CHIARI, E. V. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220- 224, 1963.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 35-44, 2000.

BRUTUS, L.; CASTILLO, H.; BERNAL, C.; SALAS, N. A.; SCHNEIDER D.; SANTALLA, J. A.; CHIPPAUX, J. P. Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1044–1047, 2010.

BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SANTOS, L. S.; CASTRO, J. A. F.; ARAUJO, I. B.; COURA, J. R. xenodiagnóstico na doença de chagas crônica. I - sensibilidade de *panstrongylus megistus* e *triatoma infestans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 4, p. 341-347, 1996.

BOSQUESI, P.L. **Avaliação da presença do grupo nitro na atividade antichagásica e mutagênica do candidato a fármaco hidroximetilnitrofurural (NFOH)**. Dissertação (mestrado). Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2009.

BUSTAMANTE, J. M.; LO PRESTI, M.S.; RIVAROLA, H. W. FERNANDEZ, A.R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R. E.; OLIVA, P. P. Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 29. n. 6, p. 733–737. 2007.

BUYSSCHAERT, I.; KEYSER, J. D.; DUJARDIN, K. Stone heart or apical retraction and calcification in Chagas' cardiomyopathy. **European Heart Journal**, v. 13, n. 7, p. 265, 2012.

CALDERÓN, J.; MAGANTO-GARCIA, E.; PUNZÓN, C.; CARRIÓN, J.; TERHORST, C.; FRESNO, M. The receptor Slamf1 on the surface of myeloid lineage cells controls susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. E1002799, 2012.

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

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; DE; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.

CDC (Centers for Disease Control & Prevention). Division of Parasitic. **Laboratory identification of Parasites of Public Health Concern**. National Center for infectious Diseases, DPDx Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>. Acesso em: 02 de março de 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanozomase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiologico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, n. 2, p. 159 - 218. 1909.

CHUNG, M. C.; Gonçalves, M. F.; Colli, W.; Ferreira, E. I.; Miranda, M. T. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antiChagasic dipeptideprodrugs of primaquine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 10, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C.; GÜIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antiChagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–4783, 2003.

CHUNG, M.C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos**. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Latentiation and advanced drug transport forms. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 155-180, 2005.

COHEN, J. P.; STURGEON, G.; COHEN, A. Measuring progress in neglected disease drug development. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 7, p. 1037–42, 2014.

COURA, J.A.; DIAZ DE TORSNZO, E.G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazol, two against Amerian trypanosomiasis (Chagas's disease). **Biomedical and Environmental Sciences. BES**, v. 1, n. 1, p. 19-33. 1988.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 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**, v. 102, n. 1, p. 113–122, 2007.

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

COURA, J.R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p.31-40, 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6–7, 2010.

DA COSTA, S.C. Immunocompromised host: from the early events until the impact of acquired immunodeficiency syndrome. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 1, p. 141–144, 2000.

CURA, C. I.; DUFFY, T.; LUCERO, R. H.; BISIO, M.; PÉNEAU, J.; JIMENEZ-COELLO, M.; CALABUIG, E.; GIMENEZ, M. J.; VALENCIA AYALA, E.; KJOS, S. A.; SANTALLA, J.; MAHANEY, S. M.; CAYO, N. M.; NAGEL, C.; BARCÁN, L.; MÁLAGA MACHACA, E. S.; ACOSTA VIANA, K. Y.; BRUTUS, L.; OCAMPO, S. B.; AZNAR, C.; CUBA CUBA, C. A.; GÜRTLER, R. E.; RAMSEY, J. M.; RIBEIRO, I.; VANDEBERG, J. L.; YADON, Z. E.; OSUNA, A.; SCHIJMAN, A. G. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003765, 2015.

DA SILVEIRA, A. B. M.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA-REIS, D. Megacolon in Chagas disease: a study of

inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v. 38, n. 8, p.1256- 1264, 2007.

DA SILVEIRA, A. B. M.; ADAD, S. J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FURNES, J. B.; D'ÁVILA REIS, D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic Chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology**, v. 134, n. 6, p. 789-796, 2007.

DAVIES, C. ; CARDOZO, R. M.; NEGRETTE, O. S.; MORA, M.C.; CHUNG, M. C.; BASOMBRIIO, M. A. Hydroxymethylnitrofurazone is Active in a Murine Model of Chaga's; Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3584-3589, 2010.

DAVIES, C.; DEY, N.; NEGRETTE, O. S.; PARADA, L. A.; BASOMBRIIO, M. A.; GARG, N. J. Hepatotoxicity in Mice of a Novel Anti-parasite Drug Candidate Hydroxymethylnitrofurazone: A Comparison with Benznidazole. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3231, 2014.

DE OLIVEIRA, E. C.; Chronic *Trypanosoma cruzi* infeccion associated to colon cancer. An experimental study in rats. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 1, p. 81-82, 1999.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral. **Cadernos de Saúde Pública** (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 1997. p. 486.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1º. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 357-592.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, G. O.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M., CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and

kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v.44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DICKERSON, M. F.; ASTORGA, N. G.; ASTORGA, N. R.; LEWIS, A. D. Chagas Disease in 2 Geriatric Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) Housed in the Pacific Northwest. **Comparative Medicine**, v. 64, n. 4, p. 323-328, 2014.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br>>, acesso em 02 de março de 2020.

DORIGUETTO, A. C.; SILVA, C. H. T. P. ; ELLENA, J. ; TROSSINI, G. H. G. ; CHIN, C. M. ; FERREIRA, E. 5-nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)semicarbazone. **Acta Crystallographica, Section C**, Crystal Structure Communications, v. E61, p. 2099-2101, 2005.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n.1, p. 179–200, 2010.

FERNANDES, C. D.; TIECHER, F. M.; BALBINOT, M. M.; LIARTE, D. B.; SCHOLL, D.; STEINDEL, M.; ROMANHA, A. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic Chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 27-32, 2009.

FERREIRA, B. L.; FERREIRA, E. R.; DE BRITO, M. V.; SALU, B. R.; OLIVA, M. L. V.; MORTARA, R.; ORIKAZA, C. M. BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 553, 2018.

FERREIRA, H. O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 209-211, 1990.

FONSECA, F. M.; ETCHEBEHERE, R. M.; QUEIROZ, D. M. M.; ROCHA, A. M. C.; JUNQUEIRA, I. S.; FONSECA, D. N.; RODRIGUES, A. L. B.; CREMA, E.; DE OLIVEIRA, A. G. Histological and endoscopic features of the stomachs of patients with Chagas disease in the era of *Helicobacter pylori*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 6, p. 739-746. 2014.

FRANCISCO, A. F. **Efeito do tratamento com benzonidazol sobre o curso da infecção pela cepa y do *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos à alteração dos estoques de ferro pelo uso da desferrioxamina**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto – MG. 2007.

FRANCISCO, A. F.; Taylor, M. C.; Chatelain, E.; Kelly, J. M. Limited Ability of Posaconazole to Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive *in Vivo* Imaging. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n. 8, p.4653–4661, 2015.

FRANCISCO, A. F.; Jayawardhana, S.; Lewis, M. D.; White, K. L.; Shackelford, D. M.; Chen, G.; Saunders, J.; Osuna-Cabello, M.; Read, K. D.; Charman, S. A.; Chatelain, E.; Kelly, J. M. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35351, 2016.

FRANCO, Y. B. A.; SILVA, I. G.; RASSI, A.; ROCHA, A. C. R. G.; SILVA, H. H. G.; RASSI, G. G. Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame, em pacientes chagásicos crônicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2002.

FUENTES, R. B.; MATURANA, M. A.; LA CRUZ, R. M. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crônica. **Revista chilena de infectología**, v. 29, n. 1, p. 82-86, 2012.

FURNESS, J. B.; CLERC, N.; KUNZE, W. A. Memory in the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 60-62, 2000.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, 2000.



FUNAYAMA, G. K.; PRADO JÚNIOR, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra Boliviana de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 75-81, 1974.

GALPARSORO, I. L. U.; FERNÁNDEZ, S. P. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. **Atención Primaria en la Red**, v. 6, p. 169 – 171, 1999.

GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.; BAPTISTA, M. M.; DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N.; BRITTO, C. C.; DOCAMPO, R.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 286-290, 2004.

GARZONI, L. R.; CALDERA, A.; MEIRELLES, M. N.; DE CASTRO, S. L.; DOCAMPO, R.; MEINTS, G.A.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 273-285, 2004.

GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I. Design and exploratory data analysis of a second generation of dendrimer prodrugs potentially antiChagasic and leishmanicide. **Molecular Diversity**, v. 17, n. 4, p. 711–720, 2013.

GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K. F. M.; RANDO, D.G.; ZAIN, M. H.; FERREIRA, E. I. Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antiChagasic and antileishmanial prodrugs. **Journal of Molecular Modeling**, v.18, n. 5, p. 2257–2269, 2012

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; MORAES, C. M.; ROSA, A. H. ROYEDA, J. A. F.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; FRACETO, L. F. Hydroxymethylnitrofurazone: Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin Inclusion Complex: A Physical–Chemistry Characterization. **Journal of Biological Physics**, v. 33, p. 445 – 453, 2007.

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; MORAES, C. M.; ROSA, A. H. LIMA, R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; FRACETO, L. F. Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 2, p. 295 – 302, 2008.

GOLDBAUM, M.; BARRETO, M, L. Commentary: The contribution and example of Carlos Chagas. **Internation Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 4, p. 697-698, 2008.

GONÇALVES, M. T.; CHUNG, M. C.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Ação da associação da primaquina e nitrofurazona em células LLC-MK2 com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 164, 1994.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision?. **Acta Tropica**, v. 119, p. 1-4, 2011.

GUIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I.; NASSUTE, J. C.; VARANDA, E. A. CHUNG, M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofurural (nitrofurazona). **Revista de Ciências Farmacêutica**, v. 22, n. 2, p. 319-333, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 179 – 180.

HABERLAND, A.; SARAVIA, S. G.; WALLUKAT, G.; ZIEBIG, R.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 2, p. 271-294, 2013.

HANSEN, M. B. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. **Pharmacology & Toxicology**, v. 92, n. 6, p. 249–257, 2003.

HERRERA, C.; BARGUES, M. D.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; VALLEJO, G. A.; GUHL, F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 535-539, 2007.

HENDERSON, G. B.; ULRICH, P.; FAIRLAMBT, A. H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M.; SELA, M.; CERAMI, A. “Subversive” substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase : Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n.15, p. 5374–5378, 1988.

HOWARD, E. J.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUENKENS, P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 121, n. 1, p. 22–33. 2014

IGOILLO-ESTEVE, M.; MAUGERI, D.; STERN, A. L.; BELUARDI, P.; CAZZULO, J. J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 649–663, 2007.

ISOLA, E. L.; LAMMEL, E. M.; GONZALEZ CAPPA, S. M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 3, p.329–335, 1986.

JELICKS, L. A.; TANOWITZ, H. G. Advances in Imaging of Animal. Models of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 75. p. 194-205. 2011.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 1–18, 2011.

KINOSHITA-YANAGA, A. T.; TOLEDO, M. J. O.; ARAÚJO, S. M.; VIER, B. P.; GOMES, M. L. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295-298, 2009

KRAUTH-SIEGEL, R.L.; INHOFF, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. **Parasitology Research**, v.90, n, 2, p. S77-S85, 2003.

KENDALL, G.; WILDERSPIN, A. F.; ASHALL, F.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 9, p. 2751–2758, 1990.

KINOSHITA-YANAGA, A. T.; TOLEDO, M. J. O.; ARAÚJO, S. M.; VIER, B. P.; GOMES, M. L. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295-298, 2009.

LA-SCALEA, M. A.; MAN CHIN, C.; FERREIRA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do NF utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA ANALÍTICA E QUALIDADE DAS ÁGUAS, 10. **Livro de Resumos**. Santa Maria: s.n., 1999.

LA-SCALEA, M. A.; MARIA, C.; MENEZES, D. S.; JULIÃO, M.; CHUNG, M. C.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, E. I. Voltammetric Behavior of Nitrofurazone and its Hydroxymethyl Prodrug with potential anti-Chagas activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 774–782, 2005.

LEPESHEVA, G. I.; OTT, R. D.; HARGROVE, T. Y.; KLESHCHENKO, Y. Y.; SCHUSTER, I.; NES, W. D.; HILL, G. C.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. **Chemistry & biology**, v. 14, n. 11, p. 1283–1293, 2007.

LEWIS, M. D.; FRANCISCO, A.F.; TAYLOR, M.C.; BURRELL-SAWARD, H.; MCLATCHIE, A.P.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v.16, n.9, p.1285–1300, 2014.

LEWIS, M. D.; FRANCISCO, A. F.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. A new experimental model for assessing drug efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection based on highly sensitive *in vivo* imaging. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 1, p.36–43, 2015.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p.899-911, 2016.

LIDANE, K. C. F.; ANDRADE, F. A.; BAVIA, L.; DAMASCENO, F. S.; BELTRAME, M. H.; MESSIAS-REASON, I. J.; SANDRI, T. L. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 166, 2019.

LIMA, A.; REIS, F.; COSTA, T. Cysteine Peptidase Inhibitors in Trypanosomatid Parasites. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 25, p. 3152–3173, 2013.

LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; CARRASCO, H. J.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; VARGAS, J.; TORRICO, F.; DIOSQUE, P.; VALENTE, V.; VALENTE, S. A.; GAUNT, M. W. Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000410, 2009.

MACHADO, D. V. P. **Avaliação comparativa da segurança hepática e cardíaca do potencial fármaco antichagásico hidroximetilnitrofural (NFOH) com nitrofurazona (NF) em coelhos.** Trabalho de Conclusão de Curso. FCF-UNESP. Araraquara-SP, 2013.

MALAFAIA, M.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MARIN-NETO, J. A.; CHUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**, v. 115, p. 1109–1123, 2007.

MARTINEZ, I. **Caracterização de duas cepas *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (BLANCHARD, 1843) (HEMIPTERA, REDUVIIDAE) coletados no ambiente silvestre.** Tese de Doutorado. FCF-UNESP. Araraquara-SP, 2004.

MARTINS, L. P. A. **Verificação da Suscetibilidade de três espécies Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) a infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial.** Araraquara, 1999. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224. 2009.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction

with the mammalian host. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 146, n. 4, p. 601– 620, 2007.

MAYA, J. D.; ORELLANA, M.; Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, n. 4, p. 323–331, 2010.

MCGAVIN M.D.; ZACHARY J.F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 5<sup>th</sup>. ed. St Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2012. p. 737 – 742.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

MELO, M.F.F. **Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco hidroximetilnitrofural, potencialmente antichagásico**. Dissertação (mestrado). Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2006.

MILES, M. A.; LANHAN, S. M.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, D. G. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 221-242, 1980.

MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; ARIAS, A. R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **British Medical Journal**, v. 326, p. 1444-1448, 2003.

MILES, M. A.; SOUZA, A. A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 217-225, 1977.

MOLINA-BERRÍOS, A.; CAMPOS-ESTRADA, C.; LAPIER, M.; DUASCO, J.; KEMMERLING, U.; GALANTI, N.; FERREIRA, J.; MORELLO, A.; LOPEZ-MUÑOZ,

R.; MAYA, J. D. Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2731–2739, 2013.

MONTALVETTI, A.; BAILEY, B. N.; MARTIN, M. B.; SEVERIN, G. W.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Bisphosphonates Are Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl Pyrophosphate Synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33930–33937, 2001.

MUÑOZ-SARAVIA, S.; HABERLAND, A.; WALLUKATINGOLF, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: Epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Reviews**, v.17, n. 1, p.45-64, 2010.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A. JR.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S. J.; YUSUF, S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1295-1306, 2015.

NASCIMENTO, R. D.; LISBOA, A. S.; FUJIWARA, R. T. FREITAS, M. A. R.; ADAD, S. J.; OLIVEIRA, R. C.; REIS, D. A.; SILVEIRA, A. B. M. Characterization of enteroglia cells and denervation process in Chagasic patients with and without megaesophagus. **Human Pathology**. v. 41, p. 528–534, 2010.

NOGUEIRA FILHO, M. A. F.; PADILHA, E. C.; CAMPOS, M. L.; MACHADO, D. V. P.; DAVANÇO, M. G.; PESTANA, K. C.; CHUNG, M. C.; PECCININI, R. G. Pharmacokinetics of Hydroxymethylnitrofurazone and Its Parent Drug Nitrofurazone in Rabbits. **Drug Metabolism Letters**, v. 7, n. 1, p. 58-64, 2013.

NOGUEIRA-PAIVA, N.C. **Avaliação do Trato Digestório de Cães Beagle Infectados com as Cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas Fases Aguda ou Crônica da Doença de Chagas Experimental**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto-MG. 2011.

NOGUEIRA-PAIVA, N. C.; FONSECA, K. S.; VIEIRA, P. M. A.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; MOURA, S. S. L.; VELOSO, V. M.; GUEDES, P. M. M.; TAFURI, W.

L.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 51-60. 2014.

OCAÑA-MAYORGA.; LLEWELLYN, M. S.; COSTALES, J. A.; MILES, M. A.; GRIJALVA, M. J. Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 4, p. 1-8, 2010.

OLIVEIRA, LCM; BUSO, AG; SIQUEIRA FILHO, L; MORAES, F; OLIVEIRA, HÁ; OLIVEIRA, RM, *et al.* Peptic disease and *Helicobacter pylori* are highly prevalent in patients with the indeterminate form of Chagas's disease: report of 21 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; v. 39. p. 209-212. 1997.

OLIVIERI, B. P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAUJO-JORGE, T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3790-3796. 2002.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J. H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. **Lancet Glob Health**. v.1, n. 6, p. 371-379, 2013.

PEREIRA, A. S. L.; RODRIGUES, D. B. R.; CASTRO, E. C. C.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 401–403. 2002.

PEREIRA, A.; ARAÚJO, R. S.; BRITO, R. R.; XAVIER, J. G.; BONDAN, E. F.; PEREIRA J.; LALLO, M. A. Camundongos imunossuprimidos farmacologicamente como modelo para estudo de infecções parasitárias oportunistas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 292-295, 2008.

PEREIRA, A. **Efeitos imunossupressores da dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida sobre linfócitos T e B de camundongos BALB/c**. Dissertação (mestrado). Universidade Paulista – UNIP. SÃO PAULO-SP. 2007.



PEREIRA, I. R.; VILAR-PEREIRA, G.; MARQUES, V.; SILVA, A. A.; CAETANO, B.; MOREIRA, O. C.; MACHADO, A. V.; BRUNA-ROMERO, OS.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. A Human Type 5 Adenovirus-Based *Trypanosoma cruzi* Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004594, 2015.

PEREIRA, S. A. L.; CORRÊA, B. S.; MINUCCI, G. P.; LOPES, G. M. A.; CASTRO, E. C. C.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. O peso do baço em chagásicos crônicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 2, p. 167–170. 1999.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, E.; AGRELO, R. S.; FIGUEROA, R. Consulta Técnica em Epidemiologia, Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 512–514, 2006.

PINAZO M. J.; EPINOSA, G.; CORTES-LLETGET, C.; POSADA, E. J.; ALDASORO, E.; OLIVEIRA, I.; MUÑOZ, J.; GÁLLEGO, M.; GASCON, J. Immunosuppression and Chagas Disease: a management Challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e1965, 2013.

PITA, S.; PASCUTTI, P. Análise Farmacofórica da Tripanotiona Redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* Complexada com Inibidores Peptídeo Miméticos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 788–804, 2012.

PINTO, F. H.; RIBEIRO, R. D.; BELDA NETO, F. M.; PRADO JUNIOR, J. C. Estudo comparativo do comportamento da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 2, p. 133-140, 1986.

PINTO, P. L. S. **Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil**. Tese (Doutorado). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2000.

PORTELLA-LINDOSO, A. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.

PORTELLA, R. S.; ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: parasite antigens sequestered in heart interstitial dendritic cells are related to persisting myocarditis in benznidazole-treated mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1023-1030, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RAETHER, W., HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. S19-S39, 2003.

RAMÍREZ, J. D.; DUQUE, M. C.; GUHL, F. Phylogenetic reconstruction based on Cytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. **Acta Tropica**, v. 119, p. 61-65, 2011.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388– 1402, 2010.

RASSI, A.; RASSI, A. J.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883 - 889, 2000.

RASSI JR, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden Death in Chagas' Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, n. 1, p. 86–96, 2001.

RASSI, J. A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-91, 2012.

REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. 12<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 41-42.

RIBEIRO, A. R. **Caracterização Biológica e Molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Chagas, 1909 (kinetoplastida, trypanosomatidae) isoladas de triatomíneos da Bahia, rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2014.

RIBEIRO, A. R. **Caracterização, Morfológica, Biológica e Molecular de Três cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (kinetoplastida, trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma sórdida* (stall) 1859 (Hemiptera, Reduviidae).** Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2010.

RIBEIRO, V.; DIAS, N.; PAIVA, T.; HAGSTROM-BEZ, L.; NITZ, N.; PRATESI, R.; HECHT, M. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal of Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7-17, 2020.

RUI, D.; DAOJUN, C.; YONGIJAN, Y. Liver and heart toxicity due to 90-dia oral exposure of ICR mice to N,N-dimethylformamide. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 357–363, 2011.

SAAVEDRA, M.; ZULANTAY, I.; APT, W.; CASTILLO, J.; ARAYA, E.; MARTÍNEZ, G.; RODRIGUEZ, J. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 382., 2016.

SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A. Chagas Disease: Progress and New Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 423–452, 2010.

SANSONETTI, P. J. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. **Nature Immunology**, v. 7, p.1237-1242, 2006.

SARTORI, A.M.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; AMATO NETO, V.; LOPES, M.H. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients. **Clinical Infection Diseases**, v. 26. n. 1, p. 177–179.1998.

SCARIM, C.B. **Estudo de Hidroximetilnitrofurazone (NFOH) na Fase Crônica da Doença de Chagas em Modelo Animal.** Dissertação (mestrado). FCF-UNESP. Araraquara-SP, 2016.

SCARIM, C.B.; DE ANDRADE, C.R.; DA ROSA, J.A.; DOS SANTOS, J.L.; CHIN, C.M. Hydroxymethylnitrofurazone treatment in indeterminate form of chronic Chagas

disease: Reduced intensity of tissue parasitism and inflammation—A histopathological study. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 99, n. 5, p. 236-248, 2018.

SCARIM, C. B.; JORNADA, D.H.; CHELUCCI, R. C.; DE ALMEIDA, L.; DOS SANTOS, J.L.; CHUNG, M. C. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824-838, 2018.

SCARIM, C. B.; RIBEIRO, A. R.; ROSA, J. A.; CHUNG, M. C. Response to different benznidazole doses in animal models of chronic phase Chagas disease: a critical review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 133-140, 2018.

SCARIM, C. B.; CHUNG, M. C. Current Challenges and Obstacles to Drug Development for Chagas Disease. **Drug Designing & Intellectual Properties International Journal**, v. 2, n. 2, p. 182-184, 2018.

SCARIM, C. B.; CHUNG, M. C. Current Approaches to Drug Discovery for Chagas Disease: Methodological Advances. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 22 n. 8, p. 509-520, 2019.

SCARIM, C. B.; CHUNG, M. C. Nitroheterocyclic derivatives: privileged scaffold for drug development against Chagas disease. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, p. 2099-2108, 2019.

SCHLEMPER JR., B. R.; ISHIDA, M. M. I.; STEINDEL, M.; GARGIONI, R. Tripomastigota muito largo como padrao morfologico de cepas de *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 191-198, 1986.

SERAFIM, E. O. P. **Hidrólise *in vitro* em plasma e *in vivo* de hidroximetilnitrofurais**. Tese (Doutorado). Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, 2008.

SERAFIM, E. O. P.; SILVA, A. T. A.; MORENO, A. H.; VIZIOLI, E. O.; FERREIRA, E. I.; PECCININI, R. G.; RIBEIRO, M. L.; CHUNG, M. C. Pharmacokinetics of Hydroxymethyl Nitrofurazone, a Promising New Prodrug for Chagas' Disease

Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 12, p. 6106-6109, 2013.

SHERLOCK, I. A. Epidemiology and Dynamics of the Vectorial Transmission of Chagas Disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 385–386, 1999.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clinica et biologica**, v. 20, n. 3, p. 191-207, 1953.

SIRIANO, L. R.; LUQUETTI, A. O.; AVELAR, J. B.; MARRA, N. L.; CASTRO, A. M. Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 569–574, 2011.

SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z. *et al.* **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 88- 123.

TASSI, E. M.; CONTINENTINO, M. A.; NASCIMENTO, E. M.; PEREIRA, B. B.; PEDROSA, R. C. Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 5, p. 456-464. 2014.

TIMM, B. L.; SILVA, P. B.; BATISTA, M. M.; SILVA, F. H. G.; SILVA, C. F.; TIDWELL, R. R.; PATRICK, D. A.; JONES, S. K.; BAKUNOV, S. A.; BAKUNOVA, S. M. SOEIRO, M. N. *In Vitro* and *In Vivo* Biological Effects of Novel Arylimidamide Derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58. n. 7. p. 3720–3726. 2014.

TROSSINI, G. H. G.; MALVEZZI, A.; T.-DO AMARAL, A.; RANGEL-YAGUI, C. O.; IZIDORO, M. A.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, L.; CHUNG, M.C.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E.I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p.62-67, 2010.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

URBINA, J. A. CONCEPCION, J. L.; CALDERA, A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; OTOMO, T.; HIYOSHI, H. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of E5700 and ER-119884, Two Novel Orally Active Squalene Synthase Inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2379-2387, 2004.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 311-318, 2009.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v.115, n.1-2, p.55–68, 2010.

VILLALBA, R.; FORNÉS, G.; ALVAREZ, M. A.; ROMÁN, J.; RUBIO, V.; FERNÁNDEZ, M. GARCÍA, J. M.; VIÑALS, M.; TORRES, A. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. **Clinical Infection Diseases**, v. 14, n. 2, p. 594-595, 1992.

VILLALTRA, F; DOBISH, M. C.; NDE, P. N.; KLESHCHENKO, Y. Y.; HARGROVE, T. Y.; JOHNSON, C. A.; WATERMAN, M. R.; JOHNSTON, J. N.; LEPESHEVA, G. I. VNI Cures Acute and Chronic Experimental Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 3, p. 504-511, 2013.

WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control? **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 28–34, 2010.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase, **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 38, n. 4, p.263–355, 2001.

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nature Medicine**, v. 19, n. 1, p. 2, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 02 de março de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas Disease. **Second report of the WHO Expert Committee World Health Organization**. Geneva, 2002. 109 p. (WHO technical report series, n. 905).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, 2013. 153 p.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and miniexon gene sequences. **Interntional Journal of Parasitology**, v. 28, p. 105-112, 1998.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALEZ, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological, relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZUMAYA-ESTRADA, F. A.; MESSENGER, L.; LOPEZ-ORDONEZ, T.; LEWIS, M. D.; FLORES-LOPEZ, C. A.; MARTÍNEZ-IBARRA, A.; PENNINGTON, P.; ROSALES, C. C.; CARRASCO, H. V.; SEGOVIA, M.; MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 1-9, 2012.

## 8. Anexos

**Anexo 1 - Experimento I. Swiss.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo INT - cepa Bolívia.

<b>Grupo INT (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cólon</b>
<b>01</b>	2,8 x 1,9 x 1,5	2,3 x 0,7 x 0,4	0,8 x 0,6 x 0,5	1,2 x 0,7 x 0,6	9,0 x 0,4 x 0,4
<b>02</b>	3,5 x 2,2 x 1,5	2,3 x 0,8 x 0,4	1,0 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,8 x 0,7	10,0 x 0,4 x 0,4
<b>03</b>	2,5 x 2,3 x 1,8	2,1 x 0,7 x 0,6	1,0 x 0,7 x 0,8	1,0 x 0,6 x 0,7	8,3 x 0,5 x 0,5
<b>04</b>	2,2 x 2,3 x 1,5	2,0 x 0,6 x 0,4	1,1 x 0,7 x 0,8	1,2 x 0,6 x 0,6	8,5 x 0,4 x 0,4
<b>05</b>	3,2 x 2,1 x 1,6	2,1 x 0,6 x 0,6	0,9 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,7	9,0 x 0,6 x 0,6
<b>06</b>	3,5 x 2,2 x 1,6	2,2 x 0,7 x 0,4	0,9 x 0,5 x 0,8	1,1 x 0,6 x 0,6	11,2 x 0,5 x 0,5
<b>07</b>	2,7 x 2,5 x 1,7	2,1 x 0,7 x 0,5	1,0 x 0,5 x 0,7	1,4 x 0,7 x 0,8	10,3 x 0,4 x 0,4
<b>08</b>	3,5 x 2,1 x 1,9	1,8 x 0,8 x 0,6	0,9 x 0,7 x 0,8		10,3 x 0,6 x 0,6

**Fonte:** dados da pesquisa.



**Anexo 2** - Experimento I. Swiss. Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo IBZN - cepa Bolívia.

<b>Grupo IBZN (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cólon</b>
<b>01</b>	2,2 x 2,0 x 1,5	1,3 x 0,4 x 0,3	0,8 x 0,6 x 0,8	0,9 x 0,6 x 0,7	8,3 x 0,5 x 0,5
<b>02</b>	2,5 x 2,0 x 1,2	1,5 x 0,4 x 0,3	0,7 x 0,4 x 0,5	1,0 x 0,6 x 0,6	9,8 x 0,5 x 0,5
<b>03</b>	-	1,3 x 0,4 x 0,6	1,0 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,8	9,2 x 0,6 x 0,6
<b>04</b>	3,2 x 2,0 x 1,6	1,5 x 0,5 x 0,6	0,9 x 0,5 x 0,7	1,1 x 0,7 x 0,7	8,0 x 0,4 x 0,4
<b>05</b>	3,2 x 2,3 x 1,2	0,9 x 0,4 x 0,3	0,9 x 0,7 x 0,9	1,2 x 0,6 x 0,7	9,5 x 0,3 x 0,3
<b>06</b>	2,6 x 1,7 x 1,2	1,6 x 0,5 x 0,5	0,9 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,7	9,5 x 0,3 x 0,3
<b>07</b>	3,1 x 2,2 x 1,3	1,5 x 0,4 x 0,4	0,8 x 0,5 x 0,6	1,0 x 0,6 x 0,7	9,0 x 0,4 x 0,4
<b>08</b>	3,0 x 1,9 x 1,4	1,3 x 0,4 x 0,5	0,8 x 0,6 x 0,6	1,2 x 0,6 x 0,7	8,5 x 0,5 x 0,5

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 3 –Experimento I. Swiss.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo INFOH, cepa Bolívia.

<b>Grupo INFOH (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cólon</b>
<b>01</b>	2,8 x 1,9 x 1,5	2,3 x 0,7 x 0,4	0,8 x 0,6 x 0,5	1,2 x 0,7 x 0,6	9,0 x 0,4 x 0,4
<b>02</b>	3,5 x 2,2 x 1,5	2,3 x 0,8 x 0,4	1,0 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,8 x 0,7	10,0 x 0,4 x 0,4
<b>03</b>	2,5 x 2,3 x 1,8	2,1 x 0,7 x 0,6	1,0 x 0,7 x 0,8	1,0 x 0,6 x 0,7	8,3 x 0,5 x 0,5
<b>04</b>	2,2 x 2,3 x 1,5	2,0 x 0,6 x 0,4	1,1 x 0,7 x 0,8	1,2 x 0,6 x 0,6	8,5 x 0,4 x 0,4
<b>05</b>	3,2 x 2,1 x 1,6	2,1 x 0,6 x 0,6	0,9 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,7	9,0 x 0,6 x 0,6
<b>06</b>	3,5 x 2,2 x 1,6	2,2 x 0,7 x 0,4	0,9 x 0,5 x 0,8	1,1 x 0,6 x 0,6	11,2 x 0,5 x 0,5
<b>07</b>	2,7 x 2,5 x 1,7	2,1 x 0,7 x 0,5	1,0 x 0,5 x 0,7	1,4 x 0,7 x 0,8	10,3 x 0,4 x 0,4
<b>08</b>	3,5 x 2,1 x 1,9	1,8 x 0,8 x 0,6	0,9 x 0,7 x 0,8		10,3 x 0,6 x 0,6

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 4 - Experimento I. C57Bl6.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo INT- cepa Bolívia.

<b>Grupo INT (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cólon</b>
<b>01</b>	1,8 x 1,1 x 1,3	1,4 x 0,3 x 0,2	0,9 x 0,6 x 0,6	1,1 x 0,5 x 0,5	7,3 x 0,2 x 0,2
<b>02</b>	3,0 x 2,1 x 1,5	2,0 x 0,6 x 0,4	0,8 x 0,5 x 0,6	1,1 x 0,5 x 0,6	8,3 x 0,4 x 0,4
<b>03</b>	3,0 x 2,1 x 1,6	1,2 x 0,6 x 0,3	0,8 x 0,4 x 0,4	1,2 x 0,7 x 0,7	8,8 x 0,4 x 0,4
<b>04</b>	2,1 x 1,7 x 1,8	1,8 x 0,6 x 0,4	1,0 x 0,4 x 0,6	1,2 x 0,6 x 0,6	8,0 x 0,4 x 0,4
<b>05</b>	2,1 x 1,6 x 1,2	1,8 x 0,3 x 0,2	0,8 x 0,6 x 0,5	1,0 x 0,5 x 0,4	7,5 x 0,3 x 0,3
<b>06</b>	2,9 x 1,9 x 1,4	0,7 x 0,4 x 0,5	0,7 x 0,4 x 0,5	1,0 x 0,5 x 0,6	6,2 x 0,3 x 0,3
<b>07</b>	3,2 x 2,2 x 1,7	1,8 x 0,6 x 0,4	0,8 x 0,5 x 0,7	1,4 x 0,5 x 0,7	10,0 x 0,7 x 0,7

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 5-** Experimento I. **C57BI6**. Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo IBZN - cepa Bolívia.

<b>Grupo IBZN (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cólon</b>
<b>01</b>	2,3 x 2,1 x 1,8	1,5 x 0,4 x 0,4	0,9 x 0,7 x 0,6	1,2 x 0,7 x 0,7	7,7 x 0,5 x 0,5
<b>02</b>	2,6 x 2,1 x 1,5	1,2 x 0,3 x 0,3	0,8 x 0,6 x 0,7	1,1 x 0,8 x 0,6	7,0 x 0,4 x 0,4
<b>03</b>	2,3 x 2,0 x 1,7	1,6 x 0,4 x 0,4	0,8 x 0,6 x 0,6	1,2 x 0,5 x 0,7	8,5 x 0,4 x 0,4
<b>04</b>	3,0 x 2,1 x 1,5	1,6 x 0,5 x 0,4	0,9 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,8	7,5 x 0,3 x 0,3
<b>05</b>	3,3 x 1,9 x 1,8	2,1 x 0,9 x 0,4	0,8 x 0,6 x 0,5	1,2 x 0,5 x 0,7	8,0 x 0,4 x 0,4
<b>06</b>	2,9 x 2,5 x 1,5	1,5 x 0,4 x 0,3		1,2 x 0,6 x 0,7	8,5 x 0,3 x 0,3
<b>07</b>	3,2 x 2,2 x 1,6	0,9 x 0,3 x 0,3	0,9 x 0,6 x 0,7	1,3 x 0,6 x 0,5	9,0 x 0,4 x 0,4
<b>08</b>	3,0 x 2,1 x 1,5	1,5 x 0,4 x 0,3	1,1 x 0,7 x 0,8	1,4 x 0,6 x 0,7	8,5 x 0,4 x 0,4

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 6 –Experimento I. C57BI6.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo INFOH, cepa Bolívia.

<b>Grupo INFOH (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cólon</b>
<b>01</b>	3,1 x 2,2 x 1,6	2,0 x 0,6 x 0,3	1,0 x 0,5 x 0,8	1,3 x 0,6 x 0,8	7,5 x 0,3 x 0,3
<b>02</b>	3,2 x 2,4 x 1,7	2,0 x 0,4 x 0,3	1,0 x 0,6 x 0,8	1,3 x 0,6 x 0,5	9,0 x 0,4 x 0,4
<b>03</b>	3,2 x 2,0 x 1,4	2,2 x 0,6 x 0,4	1,1 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,7	8,5 x 0,4 x 0,4
<b>04</b>	2,6 x 2,1 x 1,1	1,2 x 0,4 x 0,4	0,7 x 0,6 x 0,6	1,2 x 0,6 x 0,6	8,5 x 0,3 x 0,3
<b>05</b>	3,2 x 2,2 x 1,6	2,0 x 0,6 x 0,4	8,7 x 0,3 x 0,3	1,2 x 0,8 x 0,6	8,7 x 0,3 x 0,3
<b>06</b>	3,2 x 2,2 x 1,6	2,0 x 0,7 x 0,6	1,0 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,6 x 0,8	8,2 x 0,4 x 0,4
<b>07</b>	2,5 x 2,2 x 1,7	2,0 x 0,5 x 0,3	0,8 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,6 x 0,8	7,6 x 0,4 x 0,4
<b>08</b>	2,6 x 1,8 x 1,5	1,9 x 0,5 x 0,4	0,8 x 0,5 x 0,6	1,2 x 0,7 x 0,6	7,5 x 0,4 x 0,4

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 7 – Experimento II. Balb/c.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo INT - cepa Bolívia.

<b>Grupo INT (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cérebro</b>	<b>Cólon</b>	<b>Músculo Esquelético</b>
<b>01</b>	2,2 x 3,0 x 0,8	1,5 x 0,5 x 0,3	0,9 x 0,6 x 0,6	1,1 x 0,6 x 0,6	1,4 x 1,0 x 0,5	5,9 x 0,4 x 0,3	2,7 x 1,2 x 0,6
<b>02</b>	2,3 x 2,9 x 1,1	1,5 x 0,6 x 0,3	1,1 x 0,6 x 0,6	1,1 x 0,6 x 0,5	1,1 x 0,9 x 0,7	5,3 x 0,3 x 0,3	1,6 x 0,8 x 0,8
<b>05</b>	3,0 x 2,3 x 1,1	1,8 x 0,6 x 0,2	1,0 x 0,6 x 0,6	1,3 x 0,8 x 0,6	1,1 x 0,9 x 0,6	6,0 x 0,3 x 0,3	1,7 x 1,1 x 1,0
<b>06</b>	2,2 x 2,9 x 1,2	1,9 x 0,7 x 0,4	1,0 x 0,6 x 0,6	1,2 x 0,7 x 0,6	1,1 x 1,0 x 0,7	5,4 x 0,3 x 0,3	2,4 x 1,2 x 0,8
<b>07</b>	2,2 x 2,4 x 1,3	1,7 x 0,5 x 0,2	1,0 x 0,6 x 0,6	1,0 x 0,5 x 0,6	1,2 x 1,0 x 0,7	5,7 x 0,3 x 0,3	1,5 x 1,0 x 0,7
<b>08</b>	1,8 x 2,3 x 1,4	1,7 x 0,6 x 0,3	1,0 x 0,5 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,7	1,2 x 1,0 x 0,6	5,0 x 0,4 x 0,3	2,0 x 1,1 x 0,9
<b>09</b>	2,3 x 2,5 x 1,6	2,1 x 0,7 x 0,3	1,0 x 0,6 x 0,7	1,2 x 0,7 x 0,5	1,1 x 1,0 x 0,7	6,3 x 0,3 x 0,3	2,6 x 1,3 x 0,9
<b>11</b>	1,9 x 1,6 x 1,5	1,7 x 0,5 x 0,3	0,9 x 0,5 x 0,5	1,0 x 0,6 x 0,5	1,2 x 1,0 x 0,7	6,9 x 0,4 x 0,4	2,2 x 1,0 x 1,0
<b>12</b>	2,2 x 2,1 x 1,1	1,8 x 0,7 0,4	0,9 x 0,6 x 0,5	1,1 x 0,6 x 0,6	1,1 x 1,0 x 0,7	5,2 x 0,4 x 0,4	2,0 x 1,1 x 0,7

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 8 - Experimento II. Balb/c.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo INFOH - cepa Bolívia (experimento II).

<b>Grupo INFOH (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cérebro</b>	<b>Cólon</b>	<b>Músculo Esquelético</b>
<b>01</b>	2,3 x	1,4 x	1,6 x	0,9 x	0,9 x	1,1 x	6,0 x	2,4 x
	2,0 x	0,5 x	0,6 x	0,6 x	0,5 x	0,9 x	0,4 x	1,1 x
	1,1	0,2	0,3	0,6	0,5	0,6	0,3	0,7
<b>03</b>	2,4 x	1,2 x	1,5 x	0,9 x	1,0 x	1,2 x	6,8 x	2,2 x
	1,8 x	0,5 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	1,0 x	0,3 x	1,1 x
	1,4	0,2	0,3	0,5	0,5	0,7	0,3	0,7
<b>04</b>	2,6 x	1,5 x	1,6 x	0,8 x	1,0 x	1,1 x	5,4 x	2,2 x
	1,9 x	0,6 x	0,5 x	0,5 x	0,5 x	0,9 x	0,3 x	1,2 x
	1,2	0,3	0,3	0,7	0,5	0,7	0,3	0,8
<b>05</b>	2,4 x	1,6 x	1,6 x	0,9 x	1,0 x	1,2 x	5,5 x	1,6 x
	1,5 x	0,4 x	0,6 x	0,5 x	0,5 x	1,1 x	0,3 x	0,9 x
	1,4	0,2	0,3	0,6	0,5	0,5	0,3	0,7
<b>07</b>	2,5 x	1,6 x	1,6 x	0,8 x	1,1 x	1,2 x	5,0 x	1,7 x
	2,0 x	0,4 x	0,6 x	0,5 x	0,7 x	1,0 x	0,3 x	1,2 x
	1,7	0,2	0,3	0,6	0,4	0,7	0,3	0,7
<b>09</b>	1,7 x	1,6 x	1,6 x	0,9 x	1,2 x	1,1 x	4,5 x	2,3 x
	1,9 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	0,7 x	1,0 x	0,3 x	1,5 x
	1,4	0,3	0,2	0,6	0,5	0,7	0,3	0,7
<b>10</b>	2,2 x	1,5 x	1,6 x	0,9 x	1,0 x	1,2 x	5,0 x	1,7 x
	2,3 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	0,6 x	1,2 x	0,4 x	1,1 x
	1,5	0,3	0,2	0,6	0,5	0,6	0,4	0,7
<b>12</b>	2,3 x	1,5 x	1,6 x	0,9 x	1,0 x	1,2 x	5,9 x	1,8 x
	1,8 x	0,5 x	0,6 x	0,6 x	0,5 x	1,1 x	0,4 x	1,2 x
	1,2	0,3	0,3	0,7	0,5	0,6	0,4	0,7

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 9 - Experimento II. Balb/c.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo IBZN - cepa Bolívia (experimento II).

<b>Grupo IBZN (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cérebro</b>	<b>Cólon</b>	<b>Músculo Esquelé tico</b>
<b>01</b>	2,3 x	1,6 x	1,4 x	0,9 x	1,0 x	1,1 x	6,5 x	2,4 x
	1,9 x	0,6 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	1,0 x	0,2 x	1,5 x
	0,9	0,3	0,2	0,5	0,5	0,6	0,2	1,0
<b>02</b>	2,0 x	1,5 x	1,2 x	0,9 x	1,0 x	1,1 x	6,0 x	2,2 x
	1,6 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	0,6 x	0,9 x	0,3 x	1,2 x
	1,0	0,3	0,2	0,5	0,4	0,6	0,3	0,7
<b>03</b>	1,9 x	1,6 x	1,5 x	0,9 x	0,9 x	0,9 x	6,0 x	2,1 x
	2,2 x	0,5 x	0,6 x	0,6 x	0,6 x	1,0 x	0,3 x	1,3 x
	1,1	0,3	0,3	0,5	0,5	0,6	0,3	0,7
<b>04</b>	1,9 x	1,6 x	1,6 x	0,9 x	1,1 x	1,1 x	4,5 x	2,2 x
	1,7 x	0,6 x	0,4 x	0,5 x	0,5 x	1,0 x	0,3 x	1,3 x
	1,0	0,3	0,2	0,6	0,6	0,6	0,3	0,7
<b>07</b>	2,0 x	1,6 x	1,6 x	1,0 x	1,1 x	1,0 x	6,0 x	2,2 x
	1,7 x	0,6 x	0,4 x	0,6 x	0,6 x	1,0 x	0,3 x	1,6 x
	0,9	0,3	0,2	0,5	0,6	0,5	0,3	0,6
<b>08</b>	2,3 x	1,6 x	1,6 x	0,9 x	1,2 x	1,0 x	5,0 x	2,2 x
	2,1 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	0,6 x	1,0 x	0,3 x	1,0 x
	1,0	0,2	0,3	0,6	0,5	0,7	0,3	0,7
<b>09</b>	2,0 x	1,6 x	1,5 x	0,9 x	1,2 x	1,0 x	6,0 x	2,2 x
	1,6 x	0,5 x	0,5 x	0,6 x	0,7 x	1,0 x	0,3 x	1,1 x
	1,0	0,2	0,3	0,5	0,6	0,6	0,3	0,7
<b>12</b>	2,1 x	1,6 x	1,5 x	1,0 x	1,2 x	1,0 x	6,5 x	2,1 x
	1,6 x	0,6 x	0,5 x	0,6 x	0,7 x	0,9 x	0,3 x	1,0 x
	1,0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,6	0,3	0,7

**Fonte:** dados da pesquisa.



**Anexo 10 - Experimento II. Balb/c.** Análise Macroscópica dos órgãos analisados por animal, estes em comprimento x largura x altura (cm). Grupo NI, sem infecção (experimento II).

<b>Grupo NI (animal)</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Rim</b>	<b>Cérebro</b>	<b>Cólon</b>	<b>Músculo Esquelético</b>
<b>01</b>	2,2 x 1,9 x 0,9	0,9 x 0,5 x 0,3	0,9 x 0,5 x 0,5	0,9 x 0,7 x 0,4	1,1 x 1,0 x 0,6	5,5 x 0,2 x 0,2	2,1 x 2,2 x 1,4
<b>02</b>	1,8 x 1,5 x 1,1	1,2 x 0,3 x 0,2	0,9 x 0,6 x 0,6	1,1 x 0,6 x 0,5	1,1 x 0,9 x 0,5	5,2 x 0,2 x 0,2	2,7 x 2,2 x 1,5
<b>03</b>	1,7 x 1,9 x 0,9	1,3 x 0,3 x 0,2	0,9 x 0,5 x 0,5	1,2 x 0,6 x 0,5	0,9 x 0,9 x 0,6	5,4 x 0,2 x 0,2	2,1 x 1,6 x 0,9
<b>04</b>	1,8 x 1,8 x 1,1	1,1 x 0,5 x 0,2	0,9 x 0,5 x 0,5	1,0 x 0,5 x 0,6	1,1 x 0,9 x 0,5	4,7 x 0,2 x 0,2	2,3 x 1,6 x 0,9
<b>05</b>	2,4 x 2,1 x 1,6	1,5 x 0,5 x 0,3	0,8 x 0,6 x 0,6	1,0 x 0,6 x 0,6	1,0 x 1,0 x 0,6	5,0 x 0,2 x 0,2	1,9 x 1,3 x 0,8
<b>06</b>	1,6 x 1,8 x 1,5	1,5 x 0,5 x 0,3	0,9 x 0,6 x 0,5	1,1 x 0,6 x 0,6	1,1 x 1,1 x 0,6	4,4 x 0,2 x 0,2	2,4 x 1,5 x 0,9

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 11 - Codificação dos achados histopatológicos para análise estatística (baço, coração, cólon e fígado)**

<b>Codificação para análise histopatológica - Baço</b>			
<b>Parâmetros histopatológicos analisados</b>	<b>Codificação</b>		
<b>Capsula</b>	Espessa = 1	Normal = 2	Delgada = 3
<b>Polpa branca</b>	Diminuída = 1	Normal = 2	Aumentada = 3
<b>Polpa vermelha</b>	Diminuída = 1	Normal = 2	Aumentada = 3
<b>Zona Marginal</b>	Diminuída = 1	Normal = 2	Aumentada = 3
<b>Organização dos folículos</b>	Desorganizados = 0		Organizados = 1
<b>Presença de amastigotas</b>	Média sob o número total de ninhos amastigotas encontrados		

<b>Codificação para análise histopatológica - Coração</b>			
<b>Parâmetros histopatológicos analisados</b>	<b>Codificação</b>		
<b>Hipertrofia - musculatura lisa</b>	Ausente = 1		Presente = 2
<b>Infiltrado inflamatório - tipo</b>	Crônico = 1	Agudo = 2	Misto = 3
<b>Infiltrado inflamatório - intensidade</b>	Leve = 1	Moderado = 2	Intenso = 3
<b>Aglomerados inflamatórios</b>	Ausente = 0		Presente = 2
<b>Infiltrado inflamatório (pericárdio)</b>	Média sob o número total de infiltrados encontrados		
<b>Presença de amastigotas</b>	Média sob o número total de ninhos amastigotas encontrados		
<b>Calcificação distrófica</b>	Média sob o número total de calcificações encontradas		

<b>Codificação para análise histopatológica - Cólon</b>			
<b>Parâmetros histopatológicos analisados</b>	<b>Codificação</b>		
<b>Mucosa</b>	Atrofia = 1	Normal = 2	Hipertrofia = 3
<b>Submucosa – Infiltrado</b>	Agudo = 1	Crônico = 2	Misto = 3
<b>Submucosa - conjuntivação</b>	Frouxo = 1		Denso = 2
<b>GALT</b>	Ausente = 0	Organizado = 1	Desorganizado = 2
<b>Camada muscular lisa</b>	Atrofia = 1	Normal = 2	Hipertrofia = 3
<b>Presença de amastigotas</b>	Média sob o número total de ninhos amastigotas encontrados		

<b>Codificação para análise histopatológica – Fígado</b>		
<b>Parâmetros histopatológicos analisados</b>	<b>Codificação</b>	
<b>Picnose/Necrose</b>	Presente = 1	Ausente = 0
<b>Lipdose</b>	Presente = 1	Ausente = 0
<b>Infiltrado agudo</b>	Média sob o número total de infiltrados encontrados	
<b>Infiltrado misto</b>	Média sob o número total de infiltrados encontrados	
<b>Infiltrado crônico</b>	Média sob o número total de infiltrados encontrados	
<b>Presença de amastigotas</b>	Média sob o número total de ninhos amastigotas encontrados	

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Anexo 12 - Parecer do comitê de ética (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 39/2014).**

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 39/2014

Interessado: CAUÊ BENITO SCARIM

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

Projeto: Estudo do efeito do candidato a fármaco hidroximetilnitrofurural (NFOH) na fase crônica da doença de chagas em modelo animal

**Parecer nº 45/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 13 de agosto de 2014, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo do efeito do candidato a fármaco hidroximetilnitrofurural (NFOH) na fase crônica da doença de chagas em modelo animal", apresentado pelo pós-graduando CAUÊ BENITO SCARIM, sob orientação da Profa. Dra. Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 14 de agosto de 2014.



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> CARLOS CESAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA

**Anexo 13 - Parecer do comitê de ética (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 28/2018).**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araraquara



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Hidroximetilnitrofural (NFOH): Estudo da atividade em fase crônica da doença de Chagas em modelo animal e síntese de derivados solúveis", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr 28/2018, sob a responsabilidade do Pesquisador Cauê Benito Scarim, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 05 de dezembro de 2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Junho de 2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss Camundongo isogênico C57Bl/6
Nº de animais	Camundongo heterogênico Swiss: 30 Camundongo isogênico C57Bl/6: 30
Idade/Peso	4-5 semanas / 25 - 30g
Sexo	Macho
Origem	CEMIB/UNICAMP - Campinas/SP

Araraquara, 07 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN  
Coordenador da CEUA